

**VŠB – Technická univerzita Ostrava**  
**Fakulta elektrotechniky a informatiky**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

2017

Nikola Slaninová

**VŠB – Technická univerzita Ostrava**  
**Fakulta elektrotechniky a informatiky**  
**Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství**

**Analýza trombocytové studie**  
**Analysis of Blood Platelet Studies**

## Zadání bakalářské práce

Student: **Nikola Slaninová**  
Studijní program: B2649 Elektrotechnika  
Studijní obor: 3901R039 Biomedicínský technik  
Téma: **Analýza trombocytové studie**  
**Analysis of Blood Platelet Studies**  
Jazyk vypracování: čeština

### Zásady pro vypracování:

1. Literární rešerše k zadané problematice.
2. Fyziologie, patofyziologie, morfologie trombocytů, koagulační faktory a kaskády.
3. Trombogenní, aterosklerotické a predispoziční genetické znaky trombocytů.
4. Design trombocytové studie, průběh měření, extrakce dat z klinického informačního systému.
5. Návrh metodiky zpracování dat, statistická analýza dat.
6. Vytvoření modulární datové báze.
7. Vyhodnocení trombocytové studie se stanovením klinického závěru.
8. Shrnutí a zhodnocení přínosnosti výsledků.

### Seznam doporučené odborné literatury:

- [1] MOORE, Gary, Gavin KNIGHT a Andrew D BLANN. *Haematology*. New York: Oxford University Press, 2010, xxi, 643 p. Fundamentals of biomedical science. ISBN 0199568839.
- [2] BLANN, Andrew D a Nessar AHMED. *Blood science: principles and pathology*. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Inc., 2013, p. ISBN 978-1118351468.
- [3] *Comprehensive Human Physiology From Cellular Mechanisms to Integration*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996. ISBN 978-3642609466.
- [4] GAWAZ, Meinrad. *Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet drugs, coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease : 47 tables*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2001. ISBN 978-3131058119.
- [5] GREENWALT, Tibor Jack a Graham A. JAMIESON. *The blood platelet in transfusion therapy*. New York: A. R. Liss, 1978, xi, 334 p. ISBN 0845100289.
- [6] SMIT SIBINGA, C Th, P C DAS a L R OVERBY. (eds.) *Biotechnology in blood transfusion*. Boston, MA: Springer US, 1988. vol. 21. ISBN 978-1-4612-8988-3. DOI: 10.1007/978-1-4613-1761-6.
- [7] MALLEY, James D, Karen G MALLEY a Sinisa PAJEVIC. *Statistical learning for biomedical data*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011, xii, 285 p. Practical guides to biostatistics and epidemiology. ISBN 0521699096.
- [8] MCKILLUP, Steve. *Statistics explained: an Introductory guide for life scientists*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2011, xiv, 403 p. ISBN 978-0521183284.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Iveta Bryjová**

Konzultant bakalářské práce: prim. MUDr. Zenon Lasota

Datum zadání: 01.09.2016

Datum odevzdání: 28.04.2017

  
doc. Ing. Jiří Koziorek, Ph.D.  
vedoucí katedry

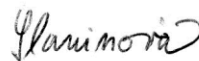


  
prof. RNDr. Václav Snášel, CSc.  
děkan fakulty

## PROHLÁŠENÍ STUDENTA

*„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.“*

V Ostravě ..... 15.4.2017

..... 

Podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

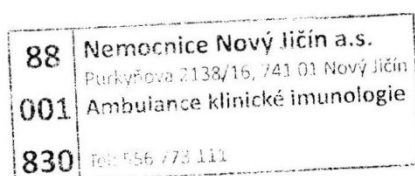
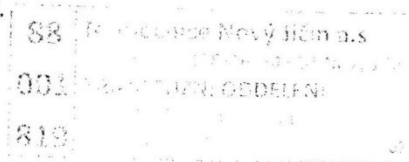
Ráda bych tímto poděkovala panu primáři MUDr. Zenonu Lasotovi a Ing. Ivetě Bryjové za konzultace a cenné rady k bakalářské práci. Dále bych pak chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za podporu při studiu.

# PROHLÁŠENÍ ZÁSTUPCE SPOLUPRACUJÍCÍ PRÁVNICKÉ NEBO FYZICKÉ OSOBY

„Souhlasím se zveřejněním této bakalářské práce dle požadavků čl. 26, odst. 9 Studijního  
a zkušebního řádu pro studium v bakalářských programech VŠB-TUO Ostrava.“

Prim. MUDr. Zenon Lasota

V Ostravě ..... 12. 04. 2017



.....  
Podpis zástupce

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá tématem trombocytové studie vytvořené v nemocnici Nový Jičín. Cílem je zanalyzovat získaná data z integrovaného klinického informačního systému IKIS. Pro studii byli vybráni vhodní dárči s určitou hodnotou krevních destiček, kterým byl odebrán trombokoncentrát. U dárců s vysokou hodnotou krevních destiček řešíme otázku, zda s kvantitou roste také životaschopnost trombocytů, dále zda je kvantita vázaná na faktory humorální či buněčné imunity nebo je odvozena od genetických predispozic. Předpokládáme, že kvalita koncentrátu je závislá na dárci. Již nyní víme, že při výběru vhodných dárců na tvorbu trombokoncentrátu, musí být zohledněny i další parametry, než jen kvantita krevních destiček v krvi.

*Klíčová slova: krevní destičky, trombus, hemostáza, krevní srážlivost, růstový faktor, tkáňový faktor, trombóza, ateroskleróza*

## ABSTRACT

This bachelor thesis deals with thrombocyte studies made in hospital in town Nový Jičín. The main aim is to analyze information obtained from an integrated clinical information system IKIS. There were chosen suitable donors for this study with certain concentration of platelets in blood and was taken platelet rich plasma. There are several questions about donors with high concentration of platelets in blood. For example, if with quantity grows viability of platelets, or if is quantity connected with humoral or cellular immunity or genetic predispositions. We assume that quality of concentrate depends on donor. Nowadays we know that the quantity of thrombocytes in blood is not the only parameter we have to study and there are many other parameters to examine.

*Keywords: blood platelets, thrombus, hemostasis, blood coagulation, growth factor, tissue factor, thrombosis, atherosclerosis*

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>10</b>
<b>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....</b>	<b>12</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>14</b>
<b>1 REŠERŠE .....</b>	<b>15</b>
1.1 Morphology and enumeration of human blood platelets .....	15
1.1.1 Materiál a použité metody .....	15
1.1.2 Výsledky .....	16
1.1.3 Závěr článku morfologie a enumerace trombocytů .....	17
1.2 Mechanism of thrombus formation.....	18
1.2.1 Dva nezávislé způsoby aktivace destiček .....	18
1.3 Role of Tissue factor in Hemostasis, Thrombosis and Vascular development .....	19
1.4 Blood coagulation.....	20
1.5 Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation.....	21
1.5.1 Materiály a metody .....	21
1.5.2 Výsledky .....	22
1.6 Growth factor levels in platelet rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count.....	24
1.6.1 Materiál a metody .....	24
1.6.2 Výsledky .....	25
1.7 The aggregation of blood platelets.....	27
1.7.1 Metody.....	27
1.7.2 Výsledky .....	28
1.7.3 Reverze agregace .....	29
1.7.4 Vliv jiných látek na agregaci.....	29
1.7.5 Závěr článku agregace krevních destiček .....	29
1.8 Fibroblast growth factors .....	29
1.8.1 Lokalizace a funkce .....	30
1.8.2 Funkce.....	30
1.8.3 Specifičnost FGF a FGFR receptorů .....	30
1.8.4 Interakce s heparin nebo heparan sulfát proteoglykany .....	31
1.8.5 Závěr článku fibroblastové růstové faktory .....	31
1.9 Platelet activation .....	31



1.9.1	Podněty destiček .....	32
1.9.2	Odezva destiček .....	32
1.9.3	Změna tvaru destiček .....	32
1.9.4	Agregace .....	33
1.9.5	Adheze .....	34
1.9.6	Sekrece .....	34
1.9.7	Transdukce stimulu (buněčná signalizace stimulu) .....	34
1.9.8	Závěr článku aktivace destiček .....	34
1.10	Závěr rešerše .....	35
<b>2</b>	<b>MORFOLOGIE TROMBOCYTŮ .....</b>	<b>37</b>
2.1	Typy granul .....	38
2.2	Koagulační faktory .....	38
2.2.1	Von Willebrandův faktor .....	39
2.2.2	Růstové faktory se zaměřením na PDGF .....	40
2.2.3	Fibroblastový faktor .....	41
2.3	Koagulační kaskáda .....	41
<b>3</b>	<b>FUNKCE DESTIČEK .....</b>	<b>44</b>
3.1	Hemostáza .....	44
3.2	Aktivita destiček .....	45
<b>4</b>	<b>PATOLOGIE DESTIČEK .....</b>	<b>46</b>
4.1	Trombogenní znaky .....	46
4.2	Aterosklerotické znaky .....	47
4.3	Predispoziční znaky .....	47
4.3.1	Protilátky proti prokoagulačním faktorům .....	48
<b>5</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>49</b>
5.1	Statistická analýza dat .....	50
5.2	Vyšetření krevního obrazu .....	52
5.2.1	Krevní destičky .....	52
5.2.2	Bílkoviny .....	53
5.2.3	Hormony .....	56
5.2.4	Koagulace .....	57
5.2.5	Agregace .....	59
5.2.6	Imunofenotypizace .....	61
5.2.7	Nezařazené .....	64
5.2.8	Leukocyty .....	67

5.3	Spearmanův korelační koeficient výsledků krevních testů .....	68
5.4	Genetické vyšetření .....	69
5.4.1	Dědičné predispozice k žilním trombózám .....	69
5.4.2	Predispozice k ateroskleróze .....	75
<b>ZÁVĚR.....</b>		<b>78</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>		<b>80</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>		<b>82</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADP	Adenosin difosfát
AMP	Adenosin monofosfát
APC	Aktivovaný protein C
ATP	Adenosintrifosfát
C	Uhlík
CD	„Cluster of designation/ differentiation“
DTT	Dithiothreitol
ECFG	Epiteliální buněčný růstový faktor
EDTA	Etylendiamintetraacetát
EGF	Epidermální růstový faktor
EPCR	Endoteliální receptor proteinu C
EPO	Erytropoetin
FGF	Fibroblastový růstový faktor
FGFR	Receptor fibroblastového růstového faktoru
GP	Glykoprotein
HGF	Hepatocytový růstový faktor
HMWK	„High Molecular Weight Kininogen“
HS	Heparan sulfát
HSPG	Heparan sulfát proteoglykan
IgA	Imunoglobulin A
IGF	Insulinu podobný růstový faktor
IKIS	Integrovaný klinický informační systém
LTA	Lymfotoxin alfa
PAF	Faktor aktivující destičky
PAI-1	Inhibitor plazminogenového aktivátoru
PAR	Proteázou aktivované receptory
PC	Destičkový koncentrát
PDGF	Dimerický glykoproteinový růstový faktor
PDGFR	Receptor pro růstový faktor PDGF
PMA	Forbol ester
PRP	Plasma bohatá na destičky
PS	Fosfatidylserin
S	Fosfor
TF	Tkáňový faktor
TFPI	Inhibitor tkáňového faktoru
TGF $\beta$ 1	Transformující růstový faktor $\beta$ 1
TGF $\beta$ 2	Transformující růstový faktor $\beta$ 2
TxA <sub>2</sub>	Tromboxan A <sub>2</sub>
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
V <sub>t</sub>	Standardní odchylka z Berksonovy rovnice [%]

a	aktivovaná forma
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
mut	mutantní alela
mRNA	jednovláknová nukleová kyselina (poslíček)
n	počet napočítaných buněk
n <sub>c</sub>	počet použitých komor
ng/ml	nanogram na mililitr
n <sub>p</sub>	počet použitých pipet
pg	pikogram
r <sub>p</sub>	Pearsonův korelační koeficient
rpm	otáčky za minutu „revolution per minute“
vWF	von Willebrandův faktor
wt	„wild type“, nemutantní alela
μl	mikrolitr

# SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

## Seznam ilustrací

Distribuce pohlaví a věku .....	25
Bodový graf pro vztahy v PRP vzorcích .....	26
Popis destičky .....	37
Koagulační kaskáda .....	43
Graf závislosti věku, četnosti výskytu a pohlaví .....	49
Céva s trombocyty a lézí endotelu.....	52
Počet krevních destiček zkoumaných pacientů za tři měření.....	53
Boxploty imunoglobulinu A, G, G4 a M.....	55
Boxploty volných řetězců Kappa a Lambda.....	55
Boxplot CIK C1q .....	56
Boxplot hormonu Serotoninu .....	57
Boxploty koagulačních faktorů a aktivity.....	58
Boxploty maximálního T-kolagenu a T-kolagenu v % za minutu .....	60
Boxploty maximálního T-ristocetinu a T-ristocetinu v % za minutu .....	60
Boxploty maximální spontánní agregace a spontánní agregace v % za minutu .....	61
Boxploty imunofenotypizace .....	63
Boxploty imunofenotypizace .....	63
Boxplot CD znaku 61+ leukocytů .....	65
Boxploty CD znaku 45RA- .....	65
Boxploty CD znaku 45RA+ .....	66
Boxploty CD znaků CD4+CD57+ a CD8+CD57+.....	66
Boxploty leukocytů (bílých krvinek).....	67
Vysvětlení vzniku homozygotů a heterozygotů.....	69
Koláčový graf Leidenské mutace .....	72
Koláčový graf mutace haplotypu HR2 .....	72
Koláčový graf aktivovaného Glykoproteinu III.....	73
Koláčový graf aktivovaného Glykoproteinu I .....	73
Koláčový graf inhibitoru plazminogenového aktivátoru .....	74
Koláčový graf EPCR.....	74
Koláčový graf eNOS (-786T>C).....	76
Koláčový graf eNOS (G894T) .....	77
Koláčový graf lymfotoxinu alfa LTA.....	77

## Seznam tabulek

Statistické parametry růstových faktorů v destičkových koncentrátech .....	23
Statistické parametry .....	26
Přehled faktorů .....	39
Přehled růstových faktorů .....	41

Přehled vrozených trombofilií .....	46
Přehled získaných trombofilií .....	46
Rizikové faktory Aterosklerózy .....	47
Statistické výsledky hodnot krevních destiček .....	52
Statistické výsledky hodnot krevních destiček .....	53
Statistické výsledky hodnot bílkovin.....	54
Statistické výsledky hodnot bílkovin.....	54
Statistické výsledky hodnot hormonů.....	56
Statistické výsledky hodnot hormonů.....	56
Statistické výsledky hodnot koagulace.....	57
Statistické výsledky hodnot koagulace.....	58
Statistické výsledky hodnot agregace.....	59
Statistické výsledky hodnot agregace.....	59
Význam jednotlivých CD znaků .....	61
Statistické výsledky hodnot imunofenotypizace.....	62
Statistické výsledky hodnot imunofenotypizace.....	62
Statistické výsledky hodnot.....	64
Statistické výsledky hodnot.....	64
Statistické výsledky hodnot leukocytů .....	67
Statistické výsledky hodnot leukocytů .....	67
Výsledky Spearmanova korelačního koeficientu.....	68
Četnost výskytu hodnot wt a mut .....	70
Četnost výskytu hodnot 4G a 5G.....	70
Genetické vyšetření pro trombofilní mutace .....	71
Genetické vyšetření pro predispozice k ateroskleróze .....	75
Četnost výskytu hodnot wt a mut .....	76

## ÚVOD

Trombocyty neboli krevní destičky se volně pohybují v krevním řečišti. Jsou to nejmenší bezjaderné útvary nacházející se v krvi. Počet krevních destiček je přibližně okolo  $150\text{--}300 \cdot 10^9$  na litr krve. Tato hodnota však může být u některých jedinců mnohem vyšší. V této práci se zabývám dárci, kteří mají hodnotu destiček vyšší než je obvyklé.

Teoretická část se skládá z rešeršní práce, která je vyhotovena z několika článků, pojednávající o morfologii trombocytů, závislosti na věku, pohlaví a počtu destiček v krvi. Dále zde popisují otázku agregace a možnosti jejího zvrácení. Důležitá funkce destiček je jejich aktivita a koagulace, možnost shlukování se a přilnutí v místě poranění. Existují dva na sobě nezávislé způsoby aktivace destiček. Trombocyty jsou také imunogenní částice, které jsou schopny lokalizovat záněty, což znamená, že reagují na mnoho změn. Neméně důležitá je i odezva destiček na různé podněty, kdy dochází k přeměně tvarů, k již zmíněné agregaci a také adhezi a dále k sekreci obsahu. V destičkách se nachází mnoho faktorů, které jsou v případě potřeby vylučovány. Jak už to v organismu bývá, ani trombocyty se nevyhnou patologickým změnám. V práci popisují základní trombogenní, aterosklerotické a predispoziční znaky.

Pro mou praktickou část této práce jsem si vybrala náhodně třicet dárců z trombocytové studie. Tato studie byla tvořena postupně v letech 2014 až 2016 a obsahuje pouze donory, kteří mají vyšší hodnoty krevních destiček, než jsou obvyklé. U těchto dárců byla udělána potřebná vyšetření, ze kterých jsem pak ve spolupráci s prim. MUDr. Zenonem Lasotou vybrala parametry vhodné k analýze. V předchozích letech bylo zjištěno, že mnoho dárců s vysokou koncentrací trombocytů nemá jejich potřebnou kvalitu k vytvoření trombokoncentrátu. Cílem této práce je zjistit, zda s kvantitou roste schopnost života destiček, a zda je kvantita závislá na humorálních a buněčných faktorech a genetických dispozicích. Jak již bylo zmíněno, kvantita není jediným důležitým parametrem při tvorbě trombokoncentrátu. Musíme zde brát ohledy i na další parametry.

# 1 REŠERŠE

## 1.1 Morphology and enumeration of human blood platelets

V článku se autoři zabývali morfologií a enumerací krevních elementů. Stavba a počet částic v krvi jsou důležitými při evaluaci normálních a narušených funkcí krevního systému. V případě krevních destiček zůstává vztah mezi morfologií a funkcí nejistý, navzdory mnoha rozsáhlým studiím. Hodnota morfologických studií je limitována okamžitou reakcí destiček s mnohými faktory, ale naopak enumerace trombocytů můžeme dosáhnout se stejnou přesností jako u erytrocytů a leukocytů, pokud použijeme vhodný roztok na rozředění krve [1].

### 1.1.1 Materiál a použité metody

#### *Stavba destiček*

Krev je odebrána z loketní žíly do sterilní injekční stříkačky. Při odběru dbáme na to, aby nedošlo ke znečištění krve vzdušnými bublinami. Odebraná krev je dále rychle předána do zkumavek, které obsahují následující antikoagulační roztoky – 14 % sulfátu hořčíku, 3,2 % citrátu sodíku, 1,6 % oxalátu draselného, 1–4 % oxalátu amoniaku, 0,8 % oxalátu draslíku s 1,2 % oxalátu amoniaku, 1–2 % oxalátu sodíku a 0,85 % chloridu sodného, který obsahuje dostatek heparinu na kubický centimetr krve. Ředění bylo prováděno v poměru 10:1, 1:1, 1:10 a 1:100 krve s protisrážlivým činidlem. Při ředění 1:1 byla plasma bohatá na destičky získána po 30 minutách sedimentace nebo pomalé centrifugace, jediná výjimka nastala při užití roztoku oxalátu amoniaku, který byl hemolytický. Antikoagulanty užití při poměru 1:1 neovlivňovaly významně pH krve. Malá kapka krve nebo plasmy byla přenesena na mikroskopické sklíčko, kde se rozprostřela mezi sklíčko a krycí sklíčko. Krycí sklíčko bylo po okraji potřeno vazelínou a preparát byl studován. Preparáty byly zkoumány v rozsahu 30 minut až 24 hodin od jejich přípravy [1].

#### *Enumerace destiček*

Čistá venózní krev byla odebrána do 10ml silikonové injekční stříkačky. V případě, že došlo ke znečištění krve vzdušnými bublinkami, byla krev vyřazena a odběr vzorku byl proveden znova. 1–2 cm<sup>3</sup> venózní krve byly odebrány do silikonových zkumavek, ze kterých se následně plnily pipety. Krev byla opět zředěna 1% oxalátem amoniaku, který se uchovává v chladicím zařízení mezi 1 °C až 5 °C. Tato teplota předchází růstu plísní a bakterií. Všechny trombocyty se počítají po 15 minutách od jejich usazení. Zde se počítají obě strany a výsledná hodnota je násobena číslem 2500, abychom dostali trombocyty v kubických milimetrech [1].



### 1.1.2 Výsledky

#### *Stavba destiček*

Morfologie krevních destiček u ředění v poměru 1:1 se mění podle použitého antikoagulantu. V roztoku oxalátu draselného nebo amonného bylo tělo destičky tmavé, s neurčitými granulami. Vývoj je rychlý, destičky jsou tlusté v porovnání s jinými destičkami v sulfátu hořčíku či citrátu sodíku. Velké množství trombů se stalo přilnavými k podložnímu nebo krycímu sklíčku. Toto se objevovalo více v případě užití oxalátu draselného než amonného. Adheze byla také frekventovanější u 1% roztoku oxalátu sodného než u 2% roztoku stejné látky. Adice 0,2% formalinu do oxalátových roztoků způsobila utlumení formace vývoje a zabránila adhezi destiček na sklo. Roztoky obsahující citrát sodný a sulfát hořčíku měnily tělo destičky do vysoce lomivého obrysu a jejich jednotlivá granula nebyla viditelná. Vývoj byl zprvu chybějící, později krátký. K tomuto docházelo především u citrátu sodného. Adheze na povrch skla se objevovala s lišící se frekvencí. Přilnavé destičky měly křehké tělo a okraje byly ve tvaru kruhu nebo mnohoúhelníku s trny. U sulfátu hořčíku se destičky měnily do kruhového tvaru. U chloridu sodného, který obsahoval heparin, destičky běžně přilnuly ke sklu, kde se shlukovaly. Jejich granula byla nápadná. Vývoj se netvaroval. Po několika hodinách docházelo ke změně v kruhový tvar. Pokud byla krev ředěna v poměru 1:100 pomocí chloridu sodného, byla přítomna oteklá forma destičky. S výjimkou chloridu sodného měly poměry 1:10 a 1:100 stejný průběh jako 1:1. Při poměru 1:10 antikoagulant ke krvi, destičky obecně přilnuly k sobě a ke sklu velmi rychle, bez formace panožek. Toto tvrzení neplatí pro 14% sulfát hořčíku. Silikonový potah sklíčka a krycího sklíčka ovlivnil stavbu destiček minimalizováním přilnavosti. Toto se neprojevilo pouze u roztoku s heparinem. Vývoj fibrinových jehliček u 14% sulfátu hořčíku probíhal do dvou hodin i přes to, že krev ve zkumavce zůstávala tekutá po dobu 24 až 48 hodin. Naopak čerstvý preparát vytvořený ze zkumavky nevykazoval stopy fibrinu, když byl poprvé vyšetřován. Při odběru krve bez použití protisrážlivého činidla se začaly jehličky fibrinu objevovat velmi snadno při pokojové teplotě [1].

#### *Enumerace destiček*

Při enumeraci destiček byl preferován roztok oxalátu amonného, protože způsobuje hemolýzu erytrocytů, což činí trombocyty snadněji identifikovatelné. Navíc mají destičky fialové zbarvení, jsou vysoce lomivé a zřetelně vzhledově odlišné od bakterií, prachu nebo plísní. Byla vytvořena studie, která měla odstranit chyby při enumeraci destiček. Studie proběhla v červenci roku 1950 a byla provedena u 10 osob mužského pohlaví ve věku mezi 20 až 41. Výzkum trval pět dní. Jedna z deseti silikonových pipet byla náhodně použita na rozředění vzorků. Čtyři komory byly vyplněny každou z pipet. V každé polovině komory bylo pět bloků po 16 čtvercích. Tento design řešil problém chyb komory a zároveň proměnlivost počítání destiček. Statistickou analýzou bylo zjištěno, že 3,2 % chyb je způsobeno chybou pipety. Proto byly podrobeny dalším testům, ve kterých se předpoklad potvrdil. Aby byly otestovány výše uvedené výzkumy, byl smíchán 1 cm<sup>3</sup> krve se 100 cm<sup>3</sup> 1% oxalátu amoniaku při teplotě 5 °C. Byla prováděna měření tohoto roztoku po tři dny. Dále se odebral čerstvý vzorek krve do 4 nesilikonových pipet a porovnal se se 4 vzorky v silikonových pipetách. Tyto pipety byly vloženy do Brian-Garrey rotoru, ve kterém rotovaly po dobu osmi hodin. Bylo zjištěno, že nedošlo ke ztrátě krevních destiček, a že není rozdíl mezi silikonovou a nesilikonovou pipetou. Dále podrobili techniky testům, zda nedošlo k pochybení z důvodů lidského faktoru. Toto bylo

testováním vyvráceno, ve výsledcích nedošlo k žádným významným odlišnostem, způsobených techniky [1].

Bylo dokázáno, že rozmanitost tvarů, kterých destičky nabývají v preparátech, záleží na jejich tloušťce a na hustotě preparátu, dále na povrchu skla, na použitém antikoagulantu a jeho koncentraci. Dalšími faktory, které mohou ovlivnit morfologii, jsou například pH nebo teplota. Předpokládá se, že stavba trombocytu může změnit také membránový potenciál buňky a výměnu iontů, která má příbuznost s bobtnáním, hemolýzou a svrašťováním erytrocytů. Vývoj fibrinu v preparátu na krycím sklíčku neznamena, že bude jeho tvorba probíhat ve zkumavkách. Existuje mnoho faktorů, jak známých, tak neznámých, které budou ovlivňovat chování destiček a jejich morfologii in vitro [1].

Při počítání destiček v komoře se prokázala menší podstatnost morfologie. V uzavřeném preparátu, vyšetřovaném při pokojové teplotě s použitím antikoagulantů, se neprojeví známky rozpadu destiček, jen morfologické změny popsané výše. Tělo zůstalo vysoce lomivé a snížila se přilnavost po přidání velkého množství protisrážlivého činidla. Souběžné ředění krve snižuje budoucí možnost přilnavosti. Roztok oxalátu amonného byl vybrán jako nejvhodnější pro počítání, protože hemolyzuje erytrocyty čímž usnadňuje identifikaci destiček a zároveň minimalizuje přilnavost destiček. Vizualizace pseudopodií vyžaduje pečlivost, ale není zásadní pro identifikaci destiček [1].

Konečné hodnocení je založeno na reprodukci a na chybách metody. Výpočet chyb hemocytometru je odvozen z Berksonovy rovnice. Za konečné chyby měření destiček mohou být považovány nepřesnosti komor, pipet nebo preparátů. Z toho vyplývá, že křehkost a adheze nemusí být hlavním zdrojem chyb [1].

### **1.1.3 Závěr článku morfologie a enumerace trombocytů**

Morfologie destiček je ovlivňována mnoha faktory. Mezi hlavní patří hustota preparátu, vlastnosti antikoagulantu a jeho koncentrace a kontaktní povrch. Protisrážlivá činidla dokážou změnit stavbu rychle a rapidně. Změny stavby po přidání antikoagulantu nemusí nutně usnadnit identifikaci trombocytů. Počty krevních destiček jsou v krvi s oxalátem během hodiny významně nižší než u čerstvé krve. Přesnost měření trombocytů je srovnatelná s přesností měření erytrocytů a leukocytů [1].

## 1.2 Mechanism of thrombus formation

### 1.2.1 Dva nezávislé způsoby aktivace destiček

Z článku mechanismus trombocytové formace jsem si vybrala pouze část, kde se hovoří o dvou způsobech aktivace destiček [2].

V minulosti byl proveden výzkum na geneticky pozměněných myších, ze kterého vyplynulo, že existují dva odlišné způsoby aktivace destiček, které mohou pracovat paralelně nebo odděleně. Jeden způsob aktivace spočívá ve vystavení destiček subendoteliálnímu kolagenu, který celý proces zahájí nebo druhá možnost, kdy se vyplaví trombin z krve nebo ze stěny cévy, který je generovaný tkáňovým faktorem. Podle druhu zranění či nemoci se v organismu spustí aktivace, kdy jeden způsob převažuje nad druhým, ale následky obou jsou stejné [2].

Interakce mezi destičkovým glykoproteinem VI (kolagenový receptor na destičce) s kolagenem z obnažené cévní stěny a glykoproteinem Ib-V-IX s kolagenem vázaným na von Willebrandův faktor vznikne přilnavost destiček v místě poranění. Důležitost výše zmíněných glykoproteinů v počátečním řetězení destiček záleží na „shear rate“ cévní stěny. Ovlivňování kolagenu pomocí glykoproteinu VI je stejně nutné, jako je podstatný glykoprotein Ib v komplexu glykoprotein Ib-V-IX. Glykoprotein VI je hlavním agonistou pro počáteční aktivaci destiček a uvolnění granul. Destičkový integrin  $\alpha_2\beta_1$  hraje podpůrnou, ale ne zásadní, roli v interakci mezi destičkou a kolagenem. Trombocytová aktivace pomocí kolagenu nemá souvislost s aktivací pomocí trombinu [2].

Tkáňový faktor je spouštěčem druhého způsobu aktivace. Tato možnost nevyžaduje narušení endotelia a nemá souvislost s von Willebrandovým faktorem a glykoproteinem VI. V tomto případě formuje tkáňový faktor komplex faktorů VIIa (enzymaticky aktivní forma faktoru VII), čímž se začne tvořit faktor IX. Tento faktor IX vyvolá proteolytickou kaskádu, způsobující generování trombinu. Trombin je schopný štěpit určité druhy enzymů receptoru 4 na povrchu destičky. Rozkladem enzymů se začne vytvářet adenosin difosfát (ADP), serotonin a tromboxan  $A_2$ , což má za následek aktivování ostatních destiček a zesílení signálu pro tvorbu trombu. Druhý způsob aktivace nám neobjasňuje, jak se destičky dostanou do místa zranění, když není vyplaven kolagen do krevního řečiště. Pravděpodobně je to způsobeno obkládáním zranění pomocí endoteliálních buněk, aby ukázaly, kde se adhesivní buňky mají začít řetězit [2].

Charakteristické experimentální podmínky mohou způsobit formaci trombu výhradně pomocí kolagenu nebo tkáňového faktoru. Přesný přínos těchto dvou možností aktivace není známý, bylo však prokázáno, že se aktivace mění podle druhu nemoci. V organismu je nadbytečné množství mechanismů spouštějících aktivaci destiček, proto jsou v těle další inhibitory, jako například glykoprotein VI nebo srážecí enzymy, které mají zpomalit tvorbu trombů. Tyto inhibitory ale neposkytují dostatečnou ochranu proti nadbytečné tvorbě a aktivaci trombů při nemocech [2].

Z článku Mechanismus trombocytové formace nám vyplynulo, že existují dva na sobě nezávislé způsoby aktivace destiček, které vždy převažují nad druhým podle druhu zranění. Jak již bylo zmíněno, aktivace se mění podle typu nemoci, může dojít buď k interakci mezi glykoproteinem VI s kolagenem z obnažené cévní stěny a glykoproteinem Ib-V-IX s kolagenem vázaným na von Willebrandův faktor nebo pomocí tkáňového faktoru, který formuje komplex faktorů VIIa. V lidském těle existují další látky, jako je srážecí enzym nebo glykoprotein VI, které mají působit

proti aktivaci destiček, aby byl organismus v rovnováze. Bohužel nemohou poskytovat komplexní ochranu proti tvorbě a aktivaci destiček ve velkém množství [2].

### **1.3 Role of Tissue factor in Hemostasis, Thrombosis and Vascular development**

Z tohoto článku jsem si vybrala pouze část s názvem „Coagulation Factor Location on Platelets“. Destičky jsou nejvíce spojovány s koagulačním procesem. Na jejich povrchu se vytváří trombin, který způsobuje srážení krve. Vedle faktu, že jsou dobře adaptovány na shromažďování koagulačních komplexů na povrchu membrány, tak rovněž nevyžadují tkáňový faktor, který je prvním iniciátorem koagulace. Normální proces hemostázy se začne vyvíjet, když je buněčný tkáňový faktor zanesen do blízkosti aktivované destičky a koagulačních faktorů [3].

Důležitá funkce destiček spočívá v jejich schopnosti přilnout v místě poranění a aktivovat se. Po aktivaci nastává na destičce velké množství změn, které umožní sloužit jako povrch pro shromažďování a aktivaci koagulačních komplexů. Destičky v neaktivním stavu nevylučují velké množství fosfatidylserinu (PS). Naopak důsledkem aktivace dojde ke zvýšení PS a vystavení membrány „outer leaflet“ až o 12 %. Vystavení PS je nezbytně nutné, ale také nevhodné pro prokoagulační vlastnosti destiček [3].

Aktivace destiček také vede k sekreci částečně aktivovaného faktoru V z alfa granul a aktivaci povrchových receptorů. Spojování koagulačních faktorů je zprostředkováváno specifickými vysoce afinitními interakcemi s proteinovými receptory [3].

Aktivované i neaktivované destičky mají množství receptorů nebo spojovacích míst pro trombin: Glykoprotein Ib/X (GP), proteázou aktivované receptory (PAR) a další. Trombin PAR je typ receptoru, který dokáže snadno přivést signál pro aktivaci destiček. Naopak GP Ib/X je charakterizován jako receptor pro von Willebrandův faktor (vWF). Také se pojí s trombinem a hraje roli v aktivaci destiček. Nicméně je pravděpodobné, že existuje více vysoce afinitních spojovacích míst pro trombin na destičkách [3].

GP Ib/IX komplex je primárním spojovacím místem pro vWF. Spojovací místa pro GP Ib/IX na vWF/faktor VIII a trombin jsou odlišné, ale oba proteiny mohou být vázány současně. Raději než zprostředkování aktivace pomocí trombinu, GP Ib/IX primárně lokalizuje trombin na povrchu destičky, kde může aktivovat další prokoagulační faktory [3].

GP Ib/IX podporuje adhezi neaktivovaných destiček v místě vaskulárního zranění. Přilnavost destiček pomocí GP Ib/IX se dá považovat za částečnou aktivaci trombocytů. Dále je vWF nosičem proteinu pro plasmový faktor VIII. Spojením vWF a GP Ib/IX se umístí faktor VIII na povrch destičky, kde je nejvýkonněji aktivován trombinem. Tímto mechanismem je relativně nestabilní aktivovaná forma faktoru VIII produkována přímo na povrch, kde podporuje koagulační reakce.

V části článku Lokace koagulačního faktoru na destičkách byl studován trombin, který se nachází na povrchu destiček a způsobuje srážení krve. Proces hemostázy se zahájí zanesením tkáňového faktoru do blízkosti aktivované destičky a koagulačních faktorů. Mezi nejdůležitější funkce destiček patří jejich přilnavost neboli adheze v místech zranění. Na aktivních i neaktivních destičkách se nachází mnoho významných míst pro spojování trombinu, existuje například trombin PAR, který

přivádí signál vedoucí k aktivaci destičky. Podstatná spojovací místa a komplexy jsou více prostudovány výše v článku [3].

## 1.4 Blood coagulation

Z článku Krevní koagulace jsem do své rešerše použila část, ve které se hovoří o dědičných a získaných trombotických poruchách [4].

Žilní trombóza je běžné onemocnění, vyskytující se více u starších lidí a ovlivňující jednoho z 1000 osob. Dědičné a získané faktory jsou zapojeny do patogeneze trombózy. Dědičné faktory mají celoživotně trvající charakter, zatímco získané jsou krátkého trvání, například u těhotenství, operací či imobilizace. Mnoho dědičných faktorů trombózy ovlivní přirozené síly mezi prokoagulantem a antikoagulantem. Nejběžnějším dědičným faktorem je mutace v genu faktoru V, která vyústí ve fenotyp zvaný APC rezistence. Tato mutace se nachází u 20 až 40 % pacientů s trombózou. Mutace faktoru V předvídá nahrazení argininu 506 pozůstatkem glutaminu, což má za následek ztrátu jednoho z APC „cleavage sites“ ve faktoru V/Va. Mutant faktoru V má plnou prokoagulační kapacitu. Duálním mechanismem působí hyperkoagulační podmínky, které charakterizují APC rezistenci. Mutace faktoru V je sdružená s poškozením a degradací faktoru Va kvůli APC, od chvíle, kdy arginin 506 je situován na jednom ze tří APC „cleavage sites“ na faktoru Va. Navíc mutace faktoru V ovlivní faktor VIIa degradací [4].

Mutace faktoru V je dominantnější v populacích bělošského původu, rozmach kolísá mezi různými zeměmi Evropy. S občasnými výjimkami je sklon k mutaci v severských zemích vyšší (10 až 15 %) než v zemích jižních (2 %). V populacích s různými etnickými skupinami, jako je například USA, činí rozmach kolem 5 %. APC odolnost je spojena s mírně zvýšeným rizikem trombózy u heterozygotů. Naopak u homozygotů je riziko velmi vysoké. Na druhou stranu APC odolné ženy mají sníženou tendenci krvácení po porodu, což během evoluce poskytlo výhodu přežití a má za následek vysoký rozmach mutace [4].

Druhou genetickou poruchou způsobující trombózu je mutace (G20210A) 3' nepřeložené oblasti protrombinového genu. Tato mutace neovlivňuje funkci protrombinu, ale je asociována s jeho mírně zvýšenou koncentrací v plazmě. Vyskytuje se přibližně u 2 % osob bílého původu a je spojena s mírně zvýšeným rizikem trombózy. Nedostatek proteinu C, proteinu S nebo antitrombinu zvyšuje možnost trombózy u heterozygotů, ale tyto nedostatky jsou neobvyklé v běžné populaci. Nedostatek proteinu C a proteinu S má stejný dopad na organismus, jako APC rezistence, zatímco nedostatek antitrombinu je mnohem riskantnější při vzniku trombózy. Vznik trombózy u individuů s jedním genetickým faktorem je nízký, kdežto u osob s více faktory, jak vrozenými, tak získanými, je vysoký.

Antifosfolipidový syndrom je získaným faktorem pro trombózu, která může mít dlouhého trvání a může způsobit jak arteriální, tak žilní trombózu. Protilátky v plasmě pacienta s tímto syndromem jsou řízené proti protein-lipidovému komplexu. Tento syndrom je úzce spojován se zvýšenými těhotenskými komplikacemi, které mohou vyústit v potrat [4].

Dědičné a získané trombotické poruchy jsou běžnými nemocemi. Dědičné faktory jsou celoživotního rázu, naopak získané jsou jen dočasné, způsobené například těhotenstvím. Nejběžnějším dědičným faktorem je mutace faktoru V, která vede k APC rezistenci. Tato APC rezistence je odolnost vůči aktivovanému proteinu C. Mutace faktoru V je také nazývána Leidenskou mutací, což je

onemocnění způsobující poruchu koagulačního systému, kdy dochází k trombofilnímu stavu, tedy zvýšené krevní srážlivosti. Tato mutace je dominantnější u osob bělošského původu a také u heterozygotů. Další genetickou poruchou je mutace protrombinového genu. Tato mutace je spojena s mírně zvýšeným obsahem protrombinu v plazmě a neexistuje na ni specifické funkční koagulační vyšetření. Všeobecně je dáno, že vznik trombózy je frekventovanější u osob s více faktory, jak vrozenými, tak získanými [4].

## **1.5 Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation**

V poslední dekádě bylo identifikováno a popsáno mnoho růstových faktorů. Endogenní růstové faktory pomáhají zorganizovat regeneraci kostí a je zdokumentováno, že užití rekombinovaných růstových faktorů může mít příznivý terapeutický vliv. Je zde také zájem o optimalizaci používání autologních růstových faktorů produkovaných po vhodných augmentačních technikách [5].

Krevní destičky obsahují mnoho odlišných růstových faktorů jako je „platelet-derived“ růstový faktor (PDGF), „transforming growth factor beta 1“ (TGF  $\beta$ 1), „transforming growth factor beta 2“ (TGF  $\beta$ 2), „epidermal growth“ faktor (EGF) a „epithelial cell growth factor“ (ECFG), tak jako růstový faktor pro hepatocyty. Ve studiích bylo ukázáno statisticky významné zvýšení kostní formace a hustoty kosti po použití trombocytových růstových faktorů dodaných destičkovými koncentráty (PC), které byly nazvány „platelet rich plasma“. PC obsahují živé neporušené destičky, které byly aktivovány přímo před aplikací, spojováním s vápníkem a trombocyty z hovězího. Význam PC také urychlil kostní spojení nekostních zubních implantátů. Navzdory zvýšenému množství indikací pro použití zmíněné PC při operacích, základní data normálních hodnot jsou prozatím nedostupná. Také možný vliv věku a pohlaví zůstává nejasný [5].

Technika použitá k získání koncentrátu souvisí s počtem krevních destiček a růstovým faktorem obsaženým v PC. Navíc donorova biologická kondice může mít rozhodující roli ve složení PC a jeho účinnosti [5].

Tato studie kvantitativně hodnotí růstový faktor v PC pomocí standartních prostředků od zdravých dárců a zvažuje možný vliv věku, pohlaví a počtu trombocytů v krvi. Protože nebylo možné vyšetřovat všechny trombocytové růstové faktory, byly v této studii zkoumány TGF  $\beta$ , PDGF a IGF. Tyto tři faktory jsou považovány za nejvíce účinné při regeneraci kostí in vivo [5].

### **1.5.1 Materiály a metody**

Mezi 20. prosincem 2000 a 27. červnem 2001 bylo sesbíráno 237 krevních vzorků od zdravých dárců (158 mužů, 79 žen). Věkový interval byl mezi roky 21 a 62 v Johannes Gutenberg University Transfusion Center (JGUTC). Před separací destiček bylo odebráno 50 ml krve pro serologickou analýzu, přímo přes kanylu. Následně JGUTC připravil přibližně 300 ml koncentrátu z destiček, použitím nesouvislé buněčné separace. Všichni dárce měli počet trombocytů v krvi větší než 150 000/ $\mu$ l, podle kritérií stanovenými JGUTC. PC vzorky byly skladovány v Eppendorfových zkumavkách při teplotě  $-78^{\circ}\text{C}$ . Následně byly rozmrazeny a centrifugovány po 10 minut při

10 000 rpm v mikrocetrifuze ihned před testováním při pokojové teplotě. Každý z 237 vzorků byl analyzován komerčním „enzyme-linked immunosorbent“ testovacím kitem (Quantikine ELISA kits, R and D diagnostic, Wiesbaden, Germany), aby kvantifikoval koncentrace PDGF AB, PDGF BB, TGF  $\beta$ 1, TGF  $\beta$ 2 a IGF I. Všechny testy růstových faktorů byly provedeny na vzorcích, které byly nejprve hluboce zmrazeny a skladovány. Zamrazování je běžnou metodou uvolňující intracelulární trombocytové faktory. Jiné studie prokázaly, že zmražením vzorků nedojde k ovlivnění biologické aktivity PDGF [5].

Všechna kvantitativní měření byla popsána pomocí souhrnné statistiky. Na popsání vztahu mezi nedotčenou krví, PC a obsahem růstových faktorů, byly použity bodové grafy a Pearsonův korelační koeficient  $r_p$ . V případě abnormalit a pro analýzu vlivu věku byl použit Spearmanův koeficient pořadové korelace. Mann-Whitney testem se zhodnotil možný vliv pohlaví na počet destiček a level růstových faktorů [5].

PC bylo získáno pomocí „Haemonetics gradient density cell separator“ (MCS 3p, Haemonetics, Munich, Germany). Tento separátor odebírá 400–450 ml nedotčené krve skrz žilní katetr, metodou nesouvislého toku. Donorova krev je obohacena o antikoagulant („1ml citrate-phosphate dextrose per 5 ml of blood“) a vtéká do rotující odstředivky, která separuje krev na erytrocyty, dále na krevní složku připravenou odstředěním krve a složenou z trombocytů a leukocytů („buffy coat“) a plazmy. Individuální zlomky začnou odstředivku opouštět, když dojde k jejímu naplnění. Toto se děje přes automatické tlakové ventily a zlomky pak vstupují do tří separátních pytlíků. Části krve je povoleno, aby znovu cirkulovala v odstředivce. To má za následek, že zotavovací rychlost destiček je vyšší, protože zůstává v komoře centrifugy po delší dobu. Po transfuzi erytrocytů a plazmy zpět dárci pokračuje dále separační proces, dokud se nenashromáždí předdefinovaný objem PC [5].

## 1.5.2 Výsledky

Průměr počtu destiček v nedotčené krvi od dárců ve studii byl  $262\,000 \pm 58\,000/\mu\text{l}$ . Průměr destiček v PC byl  $1\,419\,000 \pm 333\,000/\mu\text{l}$ . Spearmanův korelační koeficient byl  $r_s = 0,747$  pro destičky v nedotčené krvi vs. PC. Tři růstové faktory vytvářely hlavní růstové faktory v PC: PDGF AB  $125 \pm 55$  ng/ml, TGF  $\beta$   $221 \pm 92$  ng/ml a IGF I  $85 \pm 25$  ng/ml. PDGF BB  $14 \pm 9$  ng/ml a TGF  $\beta$ 2  $0,4 \pm 0,3$  ng/ml byly přítomny pouze v malém množství. Rozsahy pro různé růstové faktory ze vzorků donorů byly následující: PDGF AB 29–277 ng/ml, PDGF BB 2–33 ng/ml, TGF  $\beta$ 1 32–397 ng/ml, IGF I 40–138 ng/ml a TGF  $\beta$ 2 0,1–1,2 ng/ml. Souhrnná statistika určující normální hodnoty je dána v Tabulce 1 [5].

**Tabulka 1: Statistické parametry růstových faktorů v destičkových koncentrátech [5]**

Statistické parametry růstových faktorů v destičkových koncentrátech						
	n	Střední hodnota	95% konfidenční interval	Standardní odchylka	Minimum	Maximum
Destičky v nedotčené krvi [1000/ $\mu$ l]	237	262	225–270	58	164	464
Destičky v PRP [1000/ $\mu$ l]	237	1419	1377–1462	333	21	2716
Leukocyty v PRP [ $\mu$ l]	228	174	123–224	391	11	3530
PDGF–AB [ng/ml]	237	125	118–132	55	13	302
PDGF–BB [ng/ml]	237	14	13–15	9	1	49
TGF– $\beta$ 1 [ng/ml]	237	221	209–232	92	2	436
TGF– $\beta$ 2 [ng/ml]	237	0,4	0,4–0,5	0,3	0,04	1,7
IGF–I [ng/ml]	237	85	82–88	25	31	171
PDGF–AB [pg/100 000 trombocytů]	237	9	8–10	8	1	109
PDGF–BB [pg/100 000 trombocytů]	237	1	0,95–1,1	0,7	0,1	5,7
TGF– $\beta$ 1 [pg/100 000 trombocytů]	237	16	15–17	6	0,1	50
TGF– $\beta$ 2 [pg/100 000 trombocytů]	237	0,03	0,03–0,03	0,02	0	0,23
IGF–I [pg/100 000 trombocytů]	237	8	5–11	22	2	341

Koncentrace destiček v nedotčené krvi a PC byly mírně vyšší pro ženy než pro muže. Průměr rozdílu závislého na pohlaví pro počet destiček byl 30,430/ $\mu$ l pro nedotčenou krev a 215,230/ $\mu$ l pro PC. Koncentrace růstového faktoru v PC nezaznamenala žádnou významnou spojitost s pohlavím. Věk neměl žádný relevantní vliv na počet destiček nebo růstový faktor [5].

Počet trombocytů v PC získané JGUTC, kteří užili nesouvislou buněčnou separaci, byly v rozsahu korespondujícím hodnotám udávaným v literatuře. Měřená korelace mezi dárcovou nedotčenou krví a PC byla mírně nad hodnotou 0,7. O hladině PDGF v destičkách není zatím mnoho informací. Studie z roku 1982 našla  $7,5 \cdot 10^{-5}$  pg PDGF na destičku. V další studii z roku 1981 bylo izolováno 0,5 mg PDGF z  $3 \cdot 10^{13}$  destiček [5].

Data v této studii nevykazovala statisticky významnou korelaci mezi počtem destiček a růstovým faktorem. Tento výsledek bude možná vysvětlen vypslostí mezi individuální proměnlivostí v buněčné produkci nebo skladování cytokinů. V literatuře byl již popsán široký rozsah hladin růstových faktorů. Analýza růstových faktorů pro „washed“ trombocyty tří různých zdravých donorů v pěti různých koncentracích měla dobrou lineární korelaci, což znamená, že rozptyl koncentrací růstových faktorů pro individuální pacienty je omezený. Další příčinou pro rozptyl růstových faktorů může být proměnlivost způsobená metodou zmražení-rozmražení centrifugace. Tahle příčina se ale zdá nepravděpodobná, protože použité podmínky jsou docela drsné ( $-78^{\circ}\text{C}$  a 10 000 rpm otáček), a protože ředění bylo provedeno pěti různými alikvoty pro všechny tři dárce. Naneštěstí, data získaná v této studii demonstrují, že neexistuje prozatím žádná snadná a dostupná procedura pro analýzu individuálních hladin růstových faktorů v PC. Některé růstové faktory mohou být odhadnuty pomocí analýzy PGDF AB, bohužel toto má také omezené možnosti [5].

Očekává se, že růstový faktor v PC vede ke zlepšení regenerace kostí z různých důvodů. Je známo, že trombocyty mají hlavní funkci během procesu hojení zlomenin. Další důvod je ten, že



PC obsahuje destičky v pětinasobně vyšších koncentracích v porovnání s nedotčenou krví, z čehož můžeme předpokládat zlepšení hojení. Synergický účinek kombinace různých růstových faktorů na osteoblasty in vitro byl již také popsán v literatuře [5].

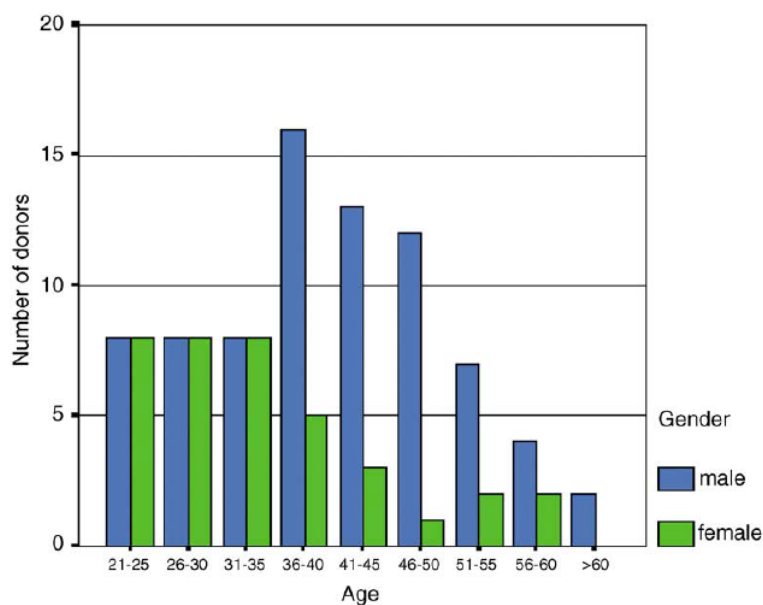
Počet krevních destiček v PC vyprodukovaný pomocí metody nesouvislé buněčné separace je předvídatelný z počtu krevních destiček v nedotčené krvi. Výsledné PC typicky obsahuje PDGF AB, TGF  $\beta$ 1 a IGF I ve vysokých koncentracích, a naopak v nízkých koncentracích PDGF BB a TGF  $\beta$ 2. Individuální vzorky ale vykazují velkou rozmanitost mezi dárči. Díky obrovské rozmanitosti různých růstových faktorů v PC můžeme předpokládat pozitivní biologický účinek na regeneraci kostí in vivo [5].

## **1.6 Growth factor levels in platelet rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count**

Krevní destičky obsahují mnoho rozdílných růstových faktorů, jako jsou PDGF, TGF  $\beta$ 1, TGF  $\beta$ 2, IGF, EGF, ECGF a HGF. Radiografické a histologické studie prokázaly, že užitím „platelet-rich plasma“ (PRP) vede ke zvýšení formace kostí a jejich hustoty. Léčba s PRP také podpořila kostní integraci dentálních implantátů. Existuje mnoho slibných klinických případů použitého PRP, ale stále chybí základní data a vyčerpávající studie o trombocytových růstových faktorech. Počet destiček a PRP růstových faktorů částečně záleží na technice, jaká byla použita k získání PRP. Určujícími faktory mohou být donorova biologická kondice. Protože je možný vliv pohlaví, věku a počtu krevních destiček, byly analyzovány vzorky z Johannes Gutenberg University Transfusion Institute. Tato studie poskytla data o koncentracích destičkových růstových faktorů a vyšetřila vliv dárčova pohlaví, věku, nedotčené krve a PRP počtu trombocytů [6].

### **1.6.1 Materiál a metody**

Krevní vzorky byly posbírány v období od 20. do 28. prosince 1999 od 213 zdravých dárců, konkrétně 158 mužů a 55 žen, ve věku 17 až 62 let. Před destičkovou separací se odebralo 50 ml neporušené krve na serologickou analýzu přes kanylu. Následně bylo připraveno 300 ml PRP koncentráту, pomocí metody nesouvislé buněčné separace. PRP vzorky byly skladovány v Eppendorfových zkumavkách v  $-78^{\circ}\text{C}$ . Poté byly rozmrazeny a centrifugovány po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Z 213 vzorků mohlo být použito pouze 115, protože obsahovaly dostatek růstových faktorů podle kritérií. Aby bylo možné analyzovat účinek věku a pohlaví, byly stratifikovány podle medicínských statistik. Rozdělení pohlaví a věku je vidět na obrázku Distribuce pohlaví a věku [6].



**Obrázek 1: Distribuce pohlaví a věku [6]**

Pro kvantifikaci koncentrací PDGF AB, PDGF BB, TGF  $\beta$ 1, TGF  $\beta$ 2 a IGF I ve všech 115 vzorcích, se použil komerční „enzyme linked immunosorbent assay kit“. Všechna kvantitativní měření byla dále popsána pomocí sumární statistiky. Na demonstraci vztahu mezi počtem trombocytů a růstového faktoru v nedotčené krvi a PRP byly použity bodové grafy a korelační koeficienty. Vliv pohlaví a věku byl ohodnocen pomocí odchylek [6].

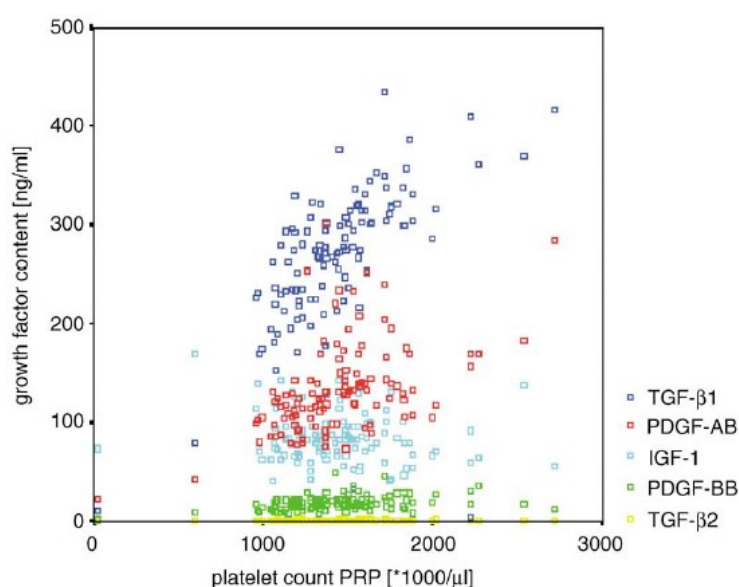
## 1.6.2 Výsledky

Počet destiček donorů z krve byl  $266\,040 \pm 60\,530/\mu\text{l}$ . Počet destiček v PRP byl  $1\,407\,640 \pm 320\,100/\mu\text{l}$ . Tři růstové faktory byly zejména nalezeny v PRP, patří zde PDGF AB, TGF  $\beta$ 1 a IGF I. V malém množství byly nalezeny PDGF BB a TGF  $\beta$ 2 [6].

Metoda buněčné nesouvislé separace pro PRP vynáší přibližně pěti složkové zvýšení koncentrace destiček v porovnání s počátečními hodnotami v dárcově krvi. Pearsonův korelační koeficient byl 0,77 pro destičky v PRP oproti nedotčené krvi. Bodový graf pro počet krevních destiček a hladin růstových faktorů odhalil pouze mírné korelace mezi těmito parametry. Vztahy jsou zaznamenány jako Tabulka 2 a Obrázek 2 [6].

**Tabulka 2: Statistické parametry [6]**

Statistické parametry							
	Destičky v nedotčené krvi [1000/ $\mu$ l]	Destičky v PRP [1000/ $\mu$ l]	PDGF- AB [ng/ml]	PDGF- BB [ng/ml]	TGF- $\beta$ 1 [ng/ml]	TGF- $\beta$ 2 [ng/ml]	IGF-I [ng/ml]
n	115	115	115	115	115	115	115
Střední hodnota	266	1408	117,5	9,9	169,4	0,4	84,2
Medián	258	1379	109,6	7,8	162,3	0,4	84,9
Standardní odchylka	61	320	63,4	7,5	84,5	0,3	23,6
Minimum	164	473	12,9	0,9	1,5	0,1	31,3
Maximum	464	2302	293,8	33,2	366,1	1,4	130,3
10%	198	1036	48,5	3	63,1	0,7	51,1
25%	220	1157	62,2	4,5	97,3	0,2	68,9
75%	304	1620	165,4	14,3	238,1	0,6	101
90%	347	1879	194	20,7	282,9	0,8	116,6



**Obrázek 2: Bodový graf pro vztahy v PRP vzorcích [6]**

Koncentrace destiček v krvi a PRP byly mírně vyšší pro ženy než pro muže. Ačkoliv byl věk zařazen do analýzy odchylky, nebyl nalezen žádný významný vliv na výstupu. Analýza odchylek pro PDGF AB, PDGF BB, TGF  $\beta$ 1 a TGF  $\beta$ 2 neukázala žádný vliv věku nebo pohlaví. Naopak hladina IGF I odhalila mírné snížení v koncentraci s věkem, ale nebyla ovlivněna pohlavím dárce [6].

Všechna měření použila ověřené komerčně dostupné ELISA kity, přičemž nebylo pozorováno žádné relevantní rozptýlení. Analyzované vzorky byly skladovány v hlubokém mrazu, což je běžná metoda pro uvolňování intracelulárních trombocytových růstových faktorů. Studie v minulosti neprokázaly žádný významný účinek zmrazení na hladinu aktivních PDGF. Počet krevních destiček

byl v normálním rozsahu. Hladina korelací nalezená mezi krví a PRP počtem destiček naznačuje, že počet krevních destiček může být použit jako hrubý odhad produkovaný nesouvislou buněčnou separací. U individuálních pacientů je obsah růstového faktoru ovlivňován mnoha dalšími neznámými faktory. Pro klinické použití PRP je ale podstatné vědět jeho obsah růstových faktorů, abychom dosáhli předpokládaných výsledků v léčbě. Nynější dostupné reporty tvrdí, že PRP léčba má slibnou budoucnost, avšak studie na toto téma zatím chybí [6].

Metoda nesouvislé buněčné separace produkuje PRP s vhodnou koncentrací trombocytů. Hlavní věkové a pohlavní rozdíly na individuální hladiny růstových faktorů nebyly nalezeny. Ačkoliv je metoda použita v této studii adekvátní pro získání PRP, stále je zde velká variabilita mezi získanými PRP od různých dárců. Technika, kterou bychom byli schopni rychle ohodnotit obsah růstového faktoru v PRP by měla velký klinický význam [6].

## 1.7 The aggregation of blood platelets

V krevním oběhu jsou krevní destičky za normálního stavu nesený separátně od sebe a není zaznamenáno, že by přilínaly k normálnímu zdravému cévnímu endotelu. Pokud dojde ke zranění cévy, destičky začnou okamžitě adhezovat k sobě a vytvářejí shluky v poškozeném místě, což znamená, že zalepí ránu a tím pomohou zadržet krvácení. Tyto agregáty se nazývají hemostatickou zátkou. Pokud jde o nemoc, jako je například ateroskleróza, trombocyty se opět nahnou do místa poškození. Zde se jedná o takzvané bílé tromby, které zvětšují svou velikost až do doby ucpání toku krve, z čehož nám vyplývá, že se jedná o okamžitou příčinu trombózy. Tento článek popisuje metody, díky kterým dochází k agregaci [7].

### 1.7.1 Metody

Lidská krev byla získána od zdravých dobrovolníků, jednu až dvě hodiny po snídani. Kovová jehla o šířce 1 mm byla připojena na deset centimetrů dlouhou polythenovou zkumavku. Bylo odebráno 45 ml krve z antekubitální žíly. Tato krev byla ihned smíchána ve zkumavkách s 0,8 ml 19% citrátu sodíku. Zkumavky byly následně centrifugovány při 500 g po dobu 20 minut při teplotě 20 °C. Vrchní vrstva, sestávající z 17 ml plasmy bohaté na destičky, byla přenesena pomocí silikonové pipety do měřicího cylindru vyrobeného z Perspexu (plexiskla). Koncentrace destiček v plasmě byla  $2-8 \cdot 10^8$  destiček na milimetr [7].

Změny optické hustoty plasmy bohaté na destičky byly stanoveny při pokojové teplotě podle následujících kritérií: vzorek 3 ml byl pipetován do průhledné zkumavky vyrobené z acetátu celulózy. Zkumavka byla vložena do absorbtimetru Unicam SP 400 a nechalo se jí projít světlo o vlnové délce 600  $\mu\text{m}$ . Černý proud byl nastaven na nekonečno a naopak optická hustota destilované vody na nulu. Na dně zkumavky byl malý železný hrot, který pomocí magnetů rotoval, čímž zajistil promíchávání plasmy. Všechny přidané přípravky byly do plasmy pipetovány předtím, než byla celá plasma promíchána [7].

## 1.7.2 Výsledky

Získaná plasma byla kalná. Zakalenost byla způsobena hlavně díky krevním destičkám. Občasně byla zakalenost způsobena tukem. Když byla plasma bohatá na destičky centrifugována při 10000 g po dobu 10 až 15 minut, destičky sedimentovaly, zatímco tuk zůstal rozptýlen. Optická hustota plasmy bohaté na destičky byla dvakrát až sedmkrát vyšší než plasmy bez destiček [7].

### *Vliv rychlosti míchání na optickou hustotu a koncentraci destiček*

Když byla plasma bohatá na destičky míchána při 1000 otáček/min, docházelo ke snížení optické hustoty a koncentrace destiček. Tento pokles nastal během půlhodiny. Vysvětlením pro tento jev bylo, že některé destičky jsou méně odolné následkům silného míchání než ostatní. Agregace destiček po přidání kalcia nastala vždy, když se vápník přidal do čerstvé plasmy. Přilnavost se projevila vždy před srážením destiček [7].

### *Vliv rychlosti míchání na rychlost přilnavosti*

Pro měření rychlosti přilnavosti byly použity změny optické hustoty plasmy. Optická hustota plasmy se snižovala za stejný čas stejně rychle, když docházelo k míchání i za klidného stavu. Při míchání 500 otáček/min byl pokles mírně pomalejší než při 1000 otáčkách/min [7].

### *Vliv vápníku na optickou hustotu*

Při výzkumu vlivu vápníku na optickou hustotu byla použita čerstvá plasma, ve které destičky nepřilnuly k sobě, když byl přidán chlorid vápenatý. Ke zvýšení optické hustoty docházelo proporcionálně k množství přidaného CaCl [7].

### *Následky po přidání adenosine difosfátu*

Adenosin difosfát (ADP) způsobuje přilnavost destiček. V případě, že bylo ADP přidáno do citrátové plasmy, došlo k agregaci až v případě, že jsme přidali i kalcium. ADP nevedlo ke srážení [7].

### *Vztah mezi přilnavostí a koncentrací destiček*

Plasma byla centrifugována při 500 g po následujících pětiminutových intervalech, aby došlo k postupnému snížení suspendovaných destiček. V každém intervalu byl vzorek plasmy smíchán se stejnou koncentrací ADP. S vyšší koncentrací destiček byla agregace rychlejší a neměla opačný účinek dříve, než po deseti minutách. Naopak při nízkých koncentracích byla přilnavost pomalejší a reverzní už po 3 minutách [7].

### *Efekt etylendiamintetraacetátu na přilnavost pomocí ADP*

Po smíchání krve s pětiprocentním etylendiamintetraacetátem (EDTA) jako antikoagulantem namísto citrátu a přimícháním ADP, nedocházelo k agregaci. Přilnavost destiček v plasmě obsahující EDTA vyžadovala přidání ADP a kalcium nebo magnesium. EDTA v plasmě vážala kalcium [7].

### **1.7.3 Reverze agregace**

Za určitých podmínek se agregované destičky byly schopny opět rozptýlit. Disperze nastala pokaždé, když byly použity nízké koncentrace ADP. Z tohoto vyplynulo, že rozptýlení může být způsobeno rozpadem ADP na adenosin monofosfát (AMP) a jiné látky [7].

### **1.7.4 Vliv jiných látek na agregaci**

Adenosin trifosfát tlumí agregaci pomocí ADP. Jiné látky jako adenin, desoxyadenosin, inosin monofosfát, inosin, guanosin, purin ribosid, cytidin a ribóza nepůsobily přilnavost v koncentracích nižších než  $5 \cdot 10^{-4}$  mol [7].

V cirkulující krvi do sebe destičky vzájemně naráží, kolidují spolu v místech, kde je turbulentní proudění krve. V tomto experimentu bylo zajištěno turbulentní proudění pomocí míchání. U některých vzorků docházelo ke snížení optické hustoty v důsledku důrazného míchání. Rychlá agregace velkého množství destiček v citrátové plasmě mohla být občas navozena přidáním kalcia a vždycky dodáním ADP [7].

### **1.7.5 Závěr článku agregace krevních destiček**

Metody popsané v článku se týkají agregací in vitro, tedy ve zkumavce. Metoda je založena na snižující se optické hustotě plasmy, která nastane při agregaci destiček. Při přidání kalcium chloridu do plasmy bohaté na destičky, došlo ke snížení optické hustoty. Pokud byl kalcium chlorid přidán do plasmy bez destiček, tento pokles nenastal. Destičky agregují občas po přidání kalcia a vždy po přidání ADP. Počáteční rychlost přilnavosti destiček s přidaným ADP byla v poměru s logaritmem jeho koncentrace. Destičky, které zbyly rozptýleny v plasmě po centrifugaci, měly menší přilnavost než nerozptýlené destičky. Agregace destiček v plasmě obsahující EDTA vyžadovaly ADP a zároveň buď kalcium, nebo magnesium. Adenosin trifosfát, desoxyadenosine a purin ribosid také inhibovaly agregaci, ale mnohem méně, než adenosin. Naopak adenin, inosin monofosfát, inosin, guanosin, cytidin a rybóza byly neefektivní [7].

## **1.8 Fibroblast growth factors**

Fibroblastový růstový faktor (FGF) vytváří velkou rodinu polypeptidových růstových faktorů, nacházejících se v organismech. 22 členů skupiny FGF sdílí 13–71 % amino kyselin. FGF mají vysokou příbuznost s heparan sulfát proteoglykany a vyžadují heparan sulfát pro aktivaci jednoho ze čtyř FGF receptorů. Během embryonálního vývoje mají FGF opačné role při regulaci buněčné proliferace, migrace a diferenciaci. U dospělých organismů jsou FGF homeostatickými faktory a mají funkci tkáňových oprav či odpovědi na zranění. FGF mohou přispět v patogenezi rakoviny při nevhodné expresi. Část FGF rodiny je důležitou součástí při transdukci signálu v centrálním a periferním nervovém systému [8].

Prototypický FGF gen obsahuje tři kódované exony, jeden obsahuje iniciační methionin a další FGF geny mají přidanou 5' přepsanou sekvenci, která se zahajuje od CUG kodonů. Velikost kódovaných částí je v rozmezí od 5 kb do 100 kb [8].

Většina FGF genů je rozptýlena po celém genomu. Bylo identifikováno 22 FGF genů v lidském organismu, z nichž většina, kromě FGF16, byla lokalizována. Některé lidské FGF geny jsou nahromaděny uvnitř genomu. FGF3, FGF4 a FGF19 jsou umístěny na chromozomu 11q13 a jsou odděleny pouhými 40 a 10 kb. FGF6 a FGF23 jsou lokalizovány v 55 kb na chromozomu 12p13, FGF17 a FGF20 na chromozomu 8p21-p22. Tato umístění genů naznačují, že FGF genový kmen byl vytvořen genovou i chromozomovou duplikací a translokací během evoluce [8].

Většina FGF sdílí podobnost vnitřní oblasti jádra s 28 vysoce zachovanými a 6 identickými aminokyselinovými zbytky. Strukturální studie FGF1 a FGF2 identifikovaly 12 antiparalelních  $\beta$  vláken v oblasti jádra proteinu. FGF1 a FGF2 mají  $\beta$  trojlístkovou strukturu, která obsahuje čtyř vláknité  $\beta$  listy aranžované do trojhranného souboru. Dvě  $\beta$  vlákna obsahují několik aminokyselinových zbytků, které utvářejí primární heparin spojující místo na FGF2 [8].

### **1.8.1 Lokalizace a funkce**

Většina FGF (FGF 3–8, 10, 15, 17–19 a 21–23) obsahují aminotermální signálové peptidy, které jsou vylučovány z buněk. FGF 9, 16 a 20 má nedostatek těchto peptidů, ale i tak jsou vylučovány. Naopak FGF1 a FGF2 má také nedostatek těchto signálových sekvencí, a nejsou vylučovány. Mohou být nalezeny na povrchu buněk. FGF1 a FGF2 může být uvolněn ze zničených buněk nebo z exocytotického mechanismu. FGF9 obsahuje neoddělenou aminotermální hydrofobickou sekvenci vyžadovanou pro sekreci. Všechny 22 FGF jsou vyjadřovány různými způsoby v tkáních [8].

### **1.8.2 Funkce**

Exprese struktur FGF naznačuje, že FGF mají významnou roli v rozvoji. FGF často signalizují epiteliální a mezenchymální hranici. Integrita těchto signalizujících drah vyžaduje extrémně přísnou regulaci FGF aktivity. Studie biochemických aktivit FGF se zaměřily na specifickou vzájemnou ovlivňování mezi FGF a FGF receptory (FGFR) [8].

### **1.8.3 Specifita FGF a FGFR receptorů**

FGFR tyrosin kináza obsahuje dvě nebo tři imunoglobulin domény a heparin spojující domény. Spojování mRNA u FGFR genu vymezuje sekvence karboxyterminální poloviny imunoglobulinové domény III, vyplývající z IIIb nebo IIIc izoformy FGFR. Tato spojovací událost je regulována v tkáni a dramaticky ovlivňuje specifitu spojování ligandů. Exon IIIb je vyjadřován v epiteliální linii a exon IIIc v mezenchymální linii. Epiteliálně vyjadřovaný FGFR2b může být aktivován pomocí FGF7 nebo FGF10, ligandy produkovanými z mezenchymální tkáně. Tyto ligandy nevykazují žádnou aktivitu proti mezenchymálně vyjadřovanému FGFR2c. Naopak FGF8 je vyjadřován epiteliální tkání a aktivován FGFR2c, ale nemá žádnou aktivitu proti FGFR2b [8].

#### **1.8.4 Interakce s heparin nebo heparan sulfát proteoglykany**

Důležitou funkcí FGF je interakce mezi FGF a heparin nebo heparan sulfátem (HS) proteoglykanem (HSPG). Tyto interakce stabilizují FGF při tepelných denaturacích a proteolýzách a vážně limitují jejich šíření a uvolňování do meziprostorových míst. FGF musí být nasyceno v blízkosti HS spojovacích míst před uplatněním efektu na tkáň. Interakce mezi FGF a HS vyústí ve formaci dimerů a oligomerů. Heparin je vyžadován pro FGF, aby došlo k efektivnímu aktivování FGFR v buňkách, které nejsou schopny syntetizovat HSPG. Studie také prokázaly, že mutace v enzimech zahrnutých v HS biosyntéze ovlivňují FGF signalizující dráhu. Další studie ukázaly zvýšení příbuznosti mezi FGF a FGFR díky heparinu [8].

Mnoho členů FGF bylo narušeno souhlasnou rekombinací. Protože FGF s podčeledí mají stejné receptor spojující vlastnosti a překrytí struktur, je pravděpodobné objevení funkční redundance [8].

#### **1.8.5 Závěr článku fibroblastové růstové faktory**

FGF byly intenzivně studovány přes 30 let. Dřívější práce se zabývaly mechanismy regulujícími stabilitu, sekrecí, exportem a interakcemi s heparinem a mechanismem a následky signálové transdukce v odlišných typech buněk. Nedávné studie se více zaměřily na mechanismus regulující specifickou receptory a jejich aktivaci, strukturu FGF-FGFR-HS komplexu a identifikaci nových členů FGF rodu. Počáteční studie se zabývaly regulací buněčné proliferace, migrací a diferenciací, nyní řeší negativní efekt FGF a FGFR na proliferaci některých buněčných typů [8].

Hlavní nevyřešené otázky se zabývají mechanismem regulujícím FGF aktivitu v přítomnosti povrchu buňky a extracelulárního HSPG. Nynější hypotéza předpovídá, že specifický tkáňový heparanový fragment definované sekvence bude diferenciatně regulovat FGF tak, že bude kontrolovat jeho rozptyl v extracelulárním prostoru a schopnost aktivovat specifické receptory. Tento problém se vyřeší určením sekvence specifického tkáňového HS a demonstrací, zda specifická HS sekvence může modulovat spojovací specifickou FGF před předurčenou pomocí specifického FGFR [8].

Další část výzkumu by měla vysvětlit vývojové role FGF, prvně samostatně a následně v různých kombinacích. Toto zahrnuje určení, zda jeden FGF s definovanou vývojovou funkcí může reagovat s jedním či více FGFR [8].

Poslední hranicí je osvětlit primární role FGF při genetických onemocněních a rakovině. Některé FGF byly naklonovány z lidských tumorů. Je úkolem zjistit, zda FGF aktivace je etiologickým agentem v tumoru nebo je to faktor progresu v patogenezi rakoviny. Některé lidské defekty a genetické nemoci jsou způsobeny mutacemi FGF genů. Je velké množství skeletálních nemocí, způsobených mutacemi FGF [8].

### **1.9 Platelet activation**

Destičky jsou univerzální fragmenty cytoplasmy, jejichž hlavní funkcí je zadržet krvácení. V krevním řečišti plují jednotlivě jako disky. Při poranění cévy se destičky začnou adherovat, lepit se k sobě a vytvoří hemostatickou zátku. Vaskulární zranění (bez transekce, což je podélný řez) mohou



produkovat masy destiček, či bílý trombin, který přilne ke stěně cévy a slouží pro tvorbu rozsáhlejšího červeného trombinu [9].

Změny, které destičky podstoupí při formaci hemostatické zátky, mohou být duplikovány do obrovských rozměrů in vitro. Mnoho studií bylo provedeno na plasmě obohacené o destičky, která byla vytvořena centrifugací krve. Obvyklým užitým antikoagulantem byl citrát, který redukoval koncentraci ionizovaného kalcia, aby předešel koagulaci, ale zároveň, aby neinhiboval agregaci destiček. Pro některé studie byly destičky přeneseny z plazmy do solného roztoku. Bylo obtížné vytvořit zklidněné destičky, jelikož u nich dochází k snadnému podráždění. Aby došlo k resuspenzi destiček, tedy k jejich znovu rozptýlení v kapalině, musí být pH plazmy sníženo na 6,5. Alternativně mohou být destičky separovány z plazmy pomocí gelové filtrace. Abychom udrželi odpověď destiček na slabý podnět jako je adenosin 5' difosfát (ADP), médium by mělo obsahovat glukózu k udržení metabolické aktivity, buffer k minimalizování alkalizace, albumin, apyrázu ke zničení vzniklého ADP a zabránění žáruvzdornosti a ionty kalcia [9].

### **1.9.1 Podněty destiček**

Fyziologické podněty, které mohou aktivovat destičky in vivo a in vitro jsou hodně různorodé. Některé jsou částice, jako například kolagen, jiné proteolytické enzymy, jako je trombin nebo trypsin a další, jako je ADP, serotonin nebo epinefrin. Každý z těchto činitelů má specifické receptory na vnějším povrchu membrány [9].

Další stimuly vznikají za patologických podmínek. Mezi tyto patří antigen-protilátka komplex či agregovaný gamma globulin, který reaguje s Fc receptory na lidských destičkách. Faktor aktivující destičky (PAF) je produkován aktivovanými leukocyty a stimuluje destičky už za nízkých koncentrací [9].

### **1.9.2 Odezva destiček**

Je pozoruhodné, že odezva na široké množství stimulů ovlivňuje destičky v podstatě stejným způsobem. Destičky změni tvar, začnou lepit a agregovat a nakonec dojde k sekreci jejich obsahu, konkrétně alfa granul a lyzozomů. Stimulátor jako je trombin zahájí sekreci destiček během 1 až 2 sekund a je v podstatě kompletní za pár minut [9].

### **1.9.3 Změna tvaru destiček**

Mnoho stimulů způsobuje změnu tvaru destiček. Tyto změny zahrnují prvně vytvoření pseudopodií z okraje disku, takže vzniká z destičky „ostnatá koule“. S užitím epinefrinu je zachován tvar disku. Asymetrický tvar kotoučovitých destiček je přisuzován víření, které je viditelné okem, když se se suspenzí třepe. Změna tvaru je viditelná na agregometru jako pokles průchodu světla. Filopodia se formují pomocí těsných svazků aktinových vláken v neionickém detergentu. Pokud se v nich vyskytuje meromyosin, vytvoří takzvaný hrot šípů. Toto naznačuje, že filopodia nejsou pravděpodobně vysunuta z destičky za pomoci myosinu. Použitím různých metod se zjistilo, že uklidněné destičky obsahují alespoň pár dlouhých mikrofilament. Stále je nejisté, zda krátké

fragmenty mikrofilament v neaktivovaných destičkách jsou drženy molekulami, které inhibují růst dlouhých vláken. Aktin není jediným komponentem filopodií, jsou zde přítomny také tropomyosin, alfa aktin a aktin spojující protein. Dalším krokem ve změně tvaru, konkrétně z kotouče na nepravidelnou kouli, je fosforylace destičkového myosinu. Když se destičky rozptýlí po povrchu, nejprve vytáhnou krátká filopodia a poté cytoplasma vyplní prostor mezi destičkou a aktinovými vlákny. Změna tvaru s nebo i bez sekrece způsobí, že mikrotubuly, které leží pod okrajem disku, se začnou centralizovat a obklopovat granula a koncentrují se k centru destiček. Dojde k úbytku průměru mikrotubulu až o 30 či 40 % po stimulaci trombinem nebo ADP. Centralizace granul se objeví u destiček ošetřovaných taxolem, léčivem stabilizujícím mikrotubuly, které indukují, že depolymerizace mikrotubul není nezbytná. Centralizaci granul je předcházeno užitím cytochalasinu B, který může zadržet vlákna aktinu. K centralizaci granul nedojde, když jsou destičky aktivovány pomocí forbol esteru (PMA), který aktivuje protein kinázu C [9].

### 1.9.4 Agregace

ADP, trombin, serotonin, vazopresin a epinefrin zahájí agregaci během několika vteřin. Pro shlukování je také důležité tekuté stádium buď kalcia, nebo magnesia a fibrinogen. Pokud jsou destičky drážděny za pomoci ADP, objeví se na povrchu destiček speciální spojovací místa z fibrinogenu. Hlavním spojovacím místem gamma řetězce fibrinogenu je C terminální dodekapeptid, který ale sám nemůže způsobit agregaci ADP stimulovaných destiček a proto se zde vyskytuje albumin. Komplex dvou glykoproteinů (GP) na povrchu destiček, GP IIb a IIIa, vytváří receptory fibrinogenu. Tento závěr byl vyvozen z následujících: 1. Pacienti s trombastenií nemohou vázat fibrinogen a ani agregovat destičky. 2. Destičky mají 40 000 molekul GP IIb a IIIa, stejně jako je maximum molekul fibrinogenu, které mohou navázat [9].

Vnější kalcium nebo magnesium není zapotřebí k přivození receptorů fibrinogenu. Formace heterodimerního komplexu GP IIb a IIIa ve zkumavce vyžaduje kalcium. Pokud jsou izolované glykoproteiny separovány přidáním chelátu, nemohou in vitro vázat fibrinogen. Mechanismus indukce receptorů fibrinogenu je nejasný. Monoklonální protilátky, které rozeznají heterodimerní komplex GP IIb a IIIa spojují stejně povrch stimulované i nestimulované destičky. ADP nezvyšuje možnost spojování fibrinogenu k membráně. Dithiothreitol (DTT) způsobuje agregaci a spojování fibrinogenu destiček pomocí štěpení disulfidu [9].

Další teorií vzniku spojovacích míst fibrinogenu je, že po aktivaci destiček je GP IIb a IIIa ukryt v povrchu nestimulovaných destiček. Po rozptýlení destiček dojde ke zvětšení jejich povrchu, čímž fibrinogen dosáhne na GP IIb a IIIa. Stejný efekt může mít i změna tvaru [9].

Fibrinogen je nezbytný, ale ne dostačující pro agregaci. Membránový tok je také důležitou součástí. Bylo dokázáno, že agregace selže při nevhodných podmínkách, jako je zima. Tento membránový tok zajišťuje vstup makromolekul do buňky [9].

Dráždění destiček epinefrinem je odlišné od stimulace ADP nebo trombinem, protože nedochází ke změně tvaru. Fibrinogen sekretovaný z alfa granul může zprostředkovat trombin a kolagen agregaci. Za těchto podmínek je shlukování posíleno spojením fibrinogenu a trombospondinu, což je protein vylučovaný z alfa granul [9].

### **1.9.5 Adheze**

Bylo pozorováno několik mechanismů adheze destiček. Adheze destiček ke sklu je zprostředkována fibrinogenem a záleží na GP IIb a IIIa. Nicméně z nejasných důvodů, normální destičky přilnou k povrchu pokrytému fibrinogenem bez stimulace ADP [9].

Destičky přilnou k čistému kolagenu pomocí specifických receptorů. Při adhezi k vaskulárnímu subendotelu musí být aktivní i von Willebrandův faktor [9].

### **1.9.6 Sekrece**

Tři typy sekrečních granul v destičkách obsahují tyto látky. Denzní granula obsahují serotonin, ADP a ATP, lyzozomy mají hydrolytické enzymy a alfa granula destičkový faktor 4, beta tromboglobulin a destičkový růstový faktor. Pokud není sekrece zaznamenána, může být monitorována i in vitro, za pomoci měření sekretovaných produktů po přidání EDTA a zklidněním vzorku přidáním formaldehydu před centrifugací [9].

Jeden způsob sekrece zahrnuje tvorbu tromboxanu  $A_2$  ( $TxA_2$ ). Tromboxan je vytvořen z kyseliny arachidonové, která je štěpena z fosfolipidů a uvolňována během aktivace destiček. Přidáním arachidonátu, endoperoxidu nebo  $TxA_2$  působí agregaci destiček [9].

Dále byl hojně užíván trombin, protože jde o nejvíce potenciální fyziologický stimul, u kterého se objeví sekrece i u neagregovaných destiček. Alfa granula odpovídala na trombin v nižších koncentracích než u denzních granul. Obě tyto odpovědi se nazývají „Release I“. Sekrece z lyzozomů se nazývá „Release II“ a vyžaduje vyšší koncentrace trombinu. Epinefrin a ADP způsobují Release I, ale ne Release II. Sekrece těmito agonisty je podmíněna vysokými teplotami, objevující se při 37 °C. Sekrece se ukázala pouze ve spojitosti s agregací. Trombin způsobuje tvorbu velkých vakuol uvnitř buňky díky spojování alfa granul. Tyto vakuoly jsou připojeny k extracelulárnímu prostoru a nachází se v nich fibrinogen, beta tromboglobulin a destičkový faktor 4, tak stejně jako se tyto látky vážou k vnější membráně [9].

### **1.9.7 Transdukce stimulu (buněčná signalizace stimulu)**

Žádný z fyziologických agonistů (stejně působících činitelů) nemůže penetrovat membránu destičky. Nicméně zde musí existovat mechanismus, kterým se dostane agonista dovnitř do destičky a způsobí formaci aktinu na mikrofibrily a sekreci granul. Široké množství agonistů způsobuje stejné odpovědi destiček, jako jsou změny tvaru, agregace, Release I a Release II [9].

### **1.9.8 Závěr článku aktivace destiček**

Destičky jsou kotoučovitě cytoplasmatické částice, odpovídající na množství podnětů tvorbou filopodií a změnou svého tvaru, schopností vázat fibrinogen z média a sekretovat obsah některých typů granul [9].

Kyselina arachidonová je štěpena z fosfolipidů a je přeměněna na endoperoxid a poté na tromboxan  $A_2$ . Agregace je zesílena sekrecí fibrinogenu a trombospondinu, který spojuje destičky.

Odpovědi na podněty jsou zahájeny, když se agonista připojí na receptor na membráně. Následující kroky se podobají těm, které se vyskytují v jiných buňkách: rozpad fosfatidylinositol bifosfát na diacylglycerol, stimulator protein kinázy C, a inositol-1,4,5-trifosfát. Dojde ke změně tvaru z důvodu zvýšení cytoplasmatického  $\text{Ca}^{2+}$ . Sekrece je spojována s fosforylací 40 000 na 47 000 dalton proteinů za pomoci protein kinázy C [9].

Tato zjištění zvýšila povědomí o mechanismech aktivace destiček, avšak mnoho otázek stále čeká na zodpovězení [9].

## 1.10 Závěr rešerše

V této rešeršní práci jsem se zabývala terminologií a fyziologií krevních destiček. Řešila jsem zde otázku vlivu pohlaví, věku a počtu destiček v destičkových koncentrátech. Tato otázka nebyla v mé rešerši ani vyvrácena, ale ani potvrzena. Z nynějších výzkumů ale víme, že pohlaví, věk a počet destiček má vliv na kvalitu trombocytů.

V článku 1.1 jsem se seznámila s trombocyty a jejich vlastnostmi. Řešila jsem zde otázku chování trombocytů v různých koagulačních činidlech, konkrétně jak bude probíhat jejich srážení a jak se bude měnit jejich morfologie. Každý činitel působil na destičky jiným způsobem, také koncentrace měnila tvar a adhezi trombocytů. Při enumeraci bylo nejvhodnější použít roztok, který působil hemolyticky a usnadňoval počítání destiček. Jako nejvhodnější se ukázal roztok oxalátu amonného. Všechny tyto poznatky jsou podrobněji rozebrány v prvním článku, který je z roku 1950. Tuto studii jsem použila i přes její stáří, protože vzhled a chování destiček v určitých roztocích o různých koncentracích bude neměnný, pouze metody počítání destiček se mohou měnit podle nových technologií.

Další důležitou částí jsou způsoby aktivace destiček, které se po aktivaci začnou srážet. Existují dva druhy aktivace destiček, kdy převažuje vždy jeden způsob nad druhým. Tato problematika je celá shrnuta v článku 1.2 s názvem Mechanismus trombocytové formace.

Významným tématem byla Lokace koagulačního faktoru na destičkách. Dozvěděla jsem se o zahájení hemostázy, a to zanesením tkáňového faktoru k aktivované destičce. Byly zde řešeny nejpodstatnější funkce trombocytů, mezi které patří především adheze a přilnavost. Lokace koagulačních faktorů na destičce je podrobněji řešena v článku 1.3.

Vyskytují se patologické změny trombocytů, neboli trombocytové poruchy, které se dělí na dědičné a získané. Dědičné jsou rázu celoživotního, získané jsou většinou dočasné. Nejčastější jsou mutace faktoru V, které způsobují APC rezistenci, kdy dochází k odolnosti vůči proteinu C. Další mutací, je mutace protrombinového genu způsobující vyšší obsah protrombinu v plazmě. Problematika je opět více rozvinuta v článku 1.4.

Článek 1.5 a 1.6 je výzkumem Transfuzního centra Johannes Gutenberg University, obě tyto studie probíhaly v jiných letech s různým věkovým intervalem pozorovaných osob, ale byla u nich použita stejná metoda nesouvislé buněčné separace. Materiál a použité metody jsou popsány přímo v článcích. Statistické parametry z obou studií jsou zaznamenány jako Tabulka 1 a Tabulka 2. Z tabulek je viditelné, že hodnoty se mírně liší, ale nejsou zde markantní rozdíly. Toto je dáno mnoha faktory, jako je například věk, pohlaví a celková konstituce a zdraví jedince. Výčet těchto faktorů je rozhodujícím ve výrobě kvalitní „platelet-rich“ plazmy.

Článek 1.7 pojednává o agregaci krevních destiček, vysvětluje postup, jakým byly odebrány krevní vzorky od dárců. Ve výsledcích popisuje vzhled plasmy po centrifugaci, když v ní byly obsaženy destičky. Výzkum se také zabýval různými vlivy, ovlivňujícími agregaci. Všechny výsledky jsou popsány v článku.

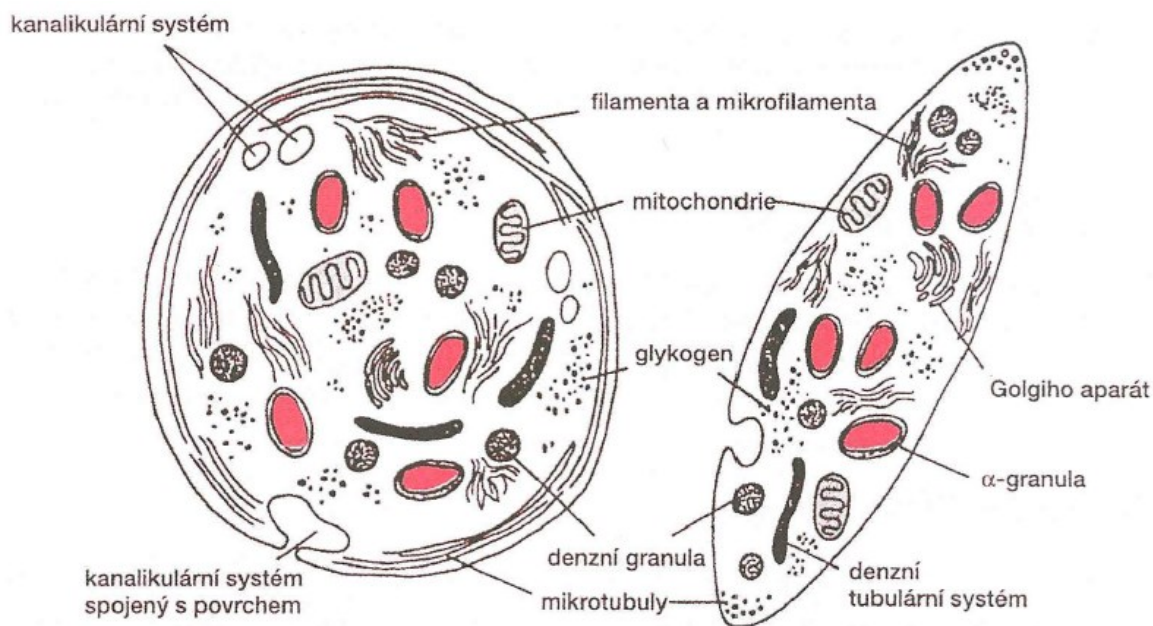
Článek 1.8 seznamuje čtenáře s fibroblastovými růstovými faktory. V textu je popsána jejich lokalizace a funkce, specifická FGF a FGF receptorů. Naopak článek 1.9 objasňuje aktivaci destiček, podněty, které mohou destičky aktivovat a jak destičky reagují. Jsou zde vysvětleny odezvy, jako je změna tvaru destiček, agregace, přilnavost či sekrece. Všechny tyto části jsou důkladněji popsány v uvedeném textu.

## 2 MORFOLOGIE TROMBOCYTŮ

Krevní destička je nejmenší bezjaderný element nacházející se v krvi. Jedná se o bezbarvé disky, které mají nepravidelný, ale okrouhlý tvar. Jejich průměr je 2–4  $\mu\text{m}$  a tloušťka 0,5–1  $\mu\text{m}$ . Počet krevních destiček je u novorozenců, adolescentů i dětí stejný a činí okolo  $150\text{--}300 \cdot 10^9$  na litr krve. Dvě třetiny destiček se vyskytují volně v krvi, zbytek je umístěn ve slezině, kde výměna ze sleziny probíhá volným způsobem. Životnost trombocyty se pohybuje okolo 9–12 dnů a vytvářejí se podle stavu organismu, ale vždy tak, aby nebyly přesáhnuty normální hodnoty pro organismus [10].

Trombocyty neobsahují jádro, a proto skoro ve většině případů nemají schopnost proteosyntézy. Proteiny obsažené v destičkách byly původně vytvořeny v megakaryocytech, jež jsou mateřskými buňkami trombocytů. Zdrojem energie destiček je glukóza získávaná z plazmy. Tvar destičky je udržován marginálními mikrotubuly, což jsou okrajová dutá vlákna, tvořící opěrný a pohybový aparát buňky. Tato vlákna tvoří skelet buňky. V povrchové membráně destiček se nachází destičkový faktor 3 (fosfolipidy). Na povrchu aktivované destičky vytvoří základ pro reakci některých enzymů koagulačního systému. V trombocytech můžeme nalézt také aktin a myozin, které napomáhají uvolňování obsahu granul [10].

Trombocyty vznikají v kostní dřeni z megakaryocytů. Jde o buňky o velikosti 35–160  $\mu\text{m}$  s původem v pluripotentních kmenových buňkách. Ve zralém megakaryocyty je polyploidní jádro a cytoplazma. Tyto buňky pak přisedají do sinusů kostní dřene a vysouvají do nich výběžky, jejichž postupným ulamováním vznikají krevní destičky, které jsou unášeny krví do organismu. Z megakaryocyty může vzniknout až 5000 trombocytů. Stimulátorem pro tvorbu destiček je glykoprotein trombopoetin, udržující vysoký počet destiček. Tento glykoprotein je tvořen v játrech. Působí proliferaci a dozrávání megakaryocytů a také ovlivňuje funkci destiček [10].



Obrázek 3: Popis destičky [10]

## 2.1 Typy granul

Pro sekreční funkci trombocytu je velmi důležitý systém spojených kanálků a vezikul v cytoplazmě. V destičkách se nachází tři typy granul, které produkují látky významné pro funkci destičky. [10]

Nachází se zde denzní granula, která fungují jako skladovací. Obsahují kalcium, serotonin, adenosindifosfát a adenosintrifosfát [10].

Dalším typem granul jsou  $\alpha$ -granula, která jsou světlejší, oválná a početnější. Zde se vyskytuje směs proteinů zahrnující destičkový faktor 4 (antagonista heparinu) a růstový faktor Platelet-Derived Growth Factor PDGF, zajišťující proliferaci buněk hladké svaloviny ve stěnách cév a fibroblastů. Granula  $\alpha$  obsahují další látky jako je fibrinogen, von Willebrandův faktor vWF, trombospodin a faktor V – proakcelerin [10].

Poslední třetí typ granul obsažených v destičkách jsou lyzosomy, které obsahují enzymy schopné štěpit bílkoviny a sacharidové komplexy. V cytoplazmě můžeme nalézt také denzní tubulární systém, ve kterém jsou enzymy pro syntézu arachidonové kyseliny. Je také zdrojem kalciových iontů [10].

## 2.2 Koagulační faktory

Koagulační faktory nesou označení římských číslic. Každý faktor má číslo podle pořadí, kdy byl objeven. Písmeno „a“ za římskou číslicí značí jeho aktivovanou formu. Syntéza koagulačních faktorů probíhá ve většině případů v játrech, existují také faktory, jež k syntéze potřebují vitamín K. Tkáňový faktor TF, jako jediný, není přítomen v plazmě. Všechny ostatní faktory se volně pohybují v plazmě ve formě proenzymů [11].

Pro vytvoření aktivního faktoru je zapotřebí jeho proteolytického štěpení. Jedinou výjimku tvoří faktor VIIa, který se v plazmě vyskytuje v malém množství již jako aktivovaný, ale jeho větší množství je neaktivní [11].

Faktory by se daly rozdělit na serinové proteázy a kofaktory. Do serinové proteázy pak patří faktor II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein. Zbylé faktory se po štěpení stávají kofaktory [11].

Faktor II, VII, IX, X a protein C jsou závislé na vitamínu K a jejich řetězce obsahují glutamovou kyselinu. Při nedostatku vitamínu K zůstávají tyto faktory deaktivovány. Hemokoagulace se stává aktivní až za přítomnosti tkáňového faktoru, jehož zdrojem jsou monocyty [11].

Faktor I, neboli fibrinogen, je rozpustný protein, tvořený polypeptidovými řetězci.

Faktor II, známý jako protrombin, patří do skupiny  $\alpha_2$ -globuliny. Vzniká z něj štěpením trombin.

Faktor III, je tkáňový faktor nebo také tromboplastin, který se aktivuje spojením s membránovým fosfolipidem.

Faktor IV, jsou vápenaté ionty, které jsou potřebné pro koagulační kaskádu.

Faktor V, proakcelerin, jde o akcelerační globulin, nebo kofaktor při aktivování protrombinu.

Faktor VI se již neuvádí, jelikož šlo o označení aktivovaného faktoru V.

Faktor VII, prokonvertin, aktivuje v koagulační kaskádě faktor X.

Faktor VIII je antihemofilický faktor, jehož nedostatek či úplné chybění je označováno jako Hemofilie A. V plazmě se vyskytuje ve spojení s von Willebrandovým faktorem.

Faktor IX je proenzym zvaný též Christmasův faktor. Přeměňuje faktor X na Xa.

Faktor X je středem reakcí při tvorbě aktivace protrombinu.

Faktor XI je plazmatickým předchůdcem tromboplastinu.

Faktor XII je počátečním faktorem vnitřní části kaskády, jde o tzv. glass faktor.

Faktor XIII se snaží o ustálení vazeb fibrinu a vytvoření fibrinové sítě. Jde o stabilizující faktor.

HMWK z anglického High Molecular Weight Kininogen, je kofaktor na začátku vnitřní části.

Prekalikrein je enzym podporující aktivaci faktorů XII a XI [10].

**Tabulka 3: Přehled faktorů [18]**

Faktor	Název
I	fibrinogen
II	protrombin
III	tromboplastin
IV	vápník
V	proakcelerin, labilní faktor, akcelerační globulin
VI	není samostatnou jednotkou, byl vypuštěn
VII	prokonvertin, SPCA, stabilní faktor
VIII	antihemofilický faktor (AHF), antihemofilický faktor A, antihemofilický globulin (AHG)
IX	plazmatická tromboplastická komponenta (PTC), Christmasův faktor, antihemofilický faktor B
X	Stuartův-Prowerův faktor
XI	plazmatický předchůdce tromboplastinu (PTA), antihemofilický faktor C
XII	Hagemanův faktor, glass faktor
XIII	faktor stabilizující fibrin, Lakiho-Lorandův faktor
HMW-K	vysokomolekulární kininogen, Fitzgeraldův faktor
Pre-K	prekalikrein, Fletcherův faktor
Ka	kalikrein
PL	destičkové fosfolipidy

### 2.2.1 Von Willebrandův faktor

Von Willebrandův faktor (vWF) je plazmatický glykoprotein, který můžeme zařadit mezi největší molekuly nacházející se v plazmě. Vzniká syntézou z megakaryocyt a endoteliálních buněk. V trombocytech se vyskytuje na alfa granulích. Po vyloučení podléhá řízené proteolýze [15].

Hlavní funkce vWF je zajistit adhezi trombocytů v místě potřeby a následnou agregaci (shlukování) destiček. Tento faktor se také váže s faktorem VIII, a tím zajišťuje jeho protekci před proteolytickou degradací [15].



### 2.2.2 Růstové faktory se zaměřením na PDGF

Růstové faktory jsou proteiny vytvářené buňkami mezenchymálního původu. Jejich účelem je indukování proliferace či diferenciace. Mají mnoho funkcí, jak je shrnuto v tabulce níže. Nás nejvíce zajímají růstové faktory, podílející se na regeneraci tkání. V těchto případech se využívají polypeptidy, které byly syntetizovány v megakaryocytech. Jsou jimi „Platelet-Derived Growth Factor“ (PDGF), „Transforming Growth Factor  $\beta$ -1“ (TGF-1), „Epidermal Growth Factor“ (EGF), „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF). Když jsou tyto faktory neaktivní, jsou uloženy v trombocytech, ze kterých se v případě potřeby uvolňují [12].

*„PDGF je produkován, kromě megakaryocytů, také dalšími buňkami, například makrofágy, fibroblasty, endoteliálními buňkami, astrocyty, myoblasty i množstvím tumorózních buněk. Expresi dvou odlišných genů 7p21-7p22 a 22q12.3-q13 vznikají dva základní řetězce aminokyselin – PDGF-A (PDGF-1) (16kDa, 124 aminokyselin) a PDGF-B (PDGF-2) (14kDa, 140 aminokyselin), které jsou identické pouze z 60 procent. Jejich kombinací a vazbou disulfidickými můstky vznikají biologicky aktivní homodimery PDGF-AA, PDGF-BB a heterodimer PDGF-AB.*

*Dimery –BB, –AB jsou cirkulující izoformy, zatímco –AA se nacházejí primárně v nestimulovaných osteoblastech. Zastoupení jednotlivých dimerů v trombocytech je 70 : 20 : 10, –AB : –BB : –AA. Biologicky aktivnější jsou –BB, –AB, které se váží na buněčné membrány na receptory  $\alpha$  i  $\beta$ , zatímco –AA pouze na receptory  $\alpha$ . Buněčné membrány PDGF-respondentních buněk (například fibroblastů, osteoblastů, chondroblastů, gliových i endoteliálních buněk) obsahují specifické PDGF receptory s hustotou exprese 40000–300000.*

*Dosud byly popsány 2 typy PDGF receptorů, a to PDGFR- $\alpha$ , který váže monomer PDGF-A a PDGF-B, a PDGFR- $\beta$ , který váže pouze PDGF-B. Receptory v dimerické podobě odpovídajícím způsobem váží izoformy PDGF-AA pouze  $\alpha$ - $\alpha$ , PDGF-AB  $\alpha$ - $\alpha$ , i  $\alpha$ - $\beta$ , PDGF-BB  $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\alpha$ - $\beta$  i  $\beta$ - $\beta$ .*

*Tvorba receptorů je usměrňována autoregulací růstového faktoru. Regulaci syntézy receptorů PDGF ovlivňuje TGF- $\beta$  a PDGF, ten ale ovlivňuje též nespecificky expresi receptorů interleukinu 1, EGF, transferinu, lipoproteinu s nízkou hustotou, různé proteinázy apod. Funkční konsenkvence heterogenity PDGF není zcela známa, dimerická forma převážně působí jako mitogen na buňky mesenchymálního původu, monomerická forma působí chemotakticky.“ [12]*

PDGF necirkuluje volně v krvi, na rozdíl od mnoha cytokinů (signální protein imunitní odpovědi). Uplatňuje se při reparaci poškozených tkání [10].

**Tabulka 4: Přehled růstových faktorů [12]**

EGF epitelový růstový faktor	submaxilární slinná žláza, Brunnerova žláza	podpora proliferace mezenchymálních, gliových a epiteliálních buněk
EPO erythropoetin	ledviny	podpora proliferace a diferenciacie erytrocytů
FGF fibroblastový růstový faktor	široké spektrum buněk	podpora širokého spektra buněk
IGF-I inzulinu podobný růstový faktor	primárně játra	podpora proliferace mnoha buněčných typů
IGF-II inzulinu podobný růstový faktor	množství buněk	podpora proliferace širokého spektra buněk primárně fetálního původu
PDGF destičkový růstový faktor	trombocyty, endoteliální buňky, placenta	podpora proliferace pojivové tkáně, glie a buněk hladkého svalstva
TGF- $\alpha$ transformující růstový faktor	T-lymfocyty, B-lymfocyty	proliferace embryonálních kmenových buněk
TGF- $\beta$ transformující růstový faktor	aktivované TH a NK buňky	protizánětlivý, podpora hojení ran inhibice proliferace mikrofágů a lymfocytů

### **2.2.3 Fibroblastový faktor**

O této problematice pojednává článek 1.8 Fibroblast growth factors.

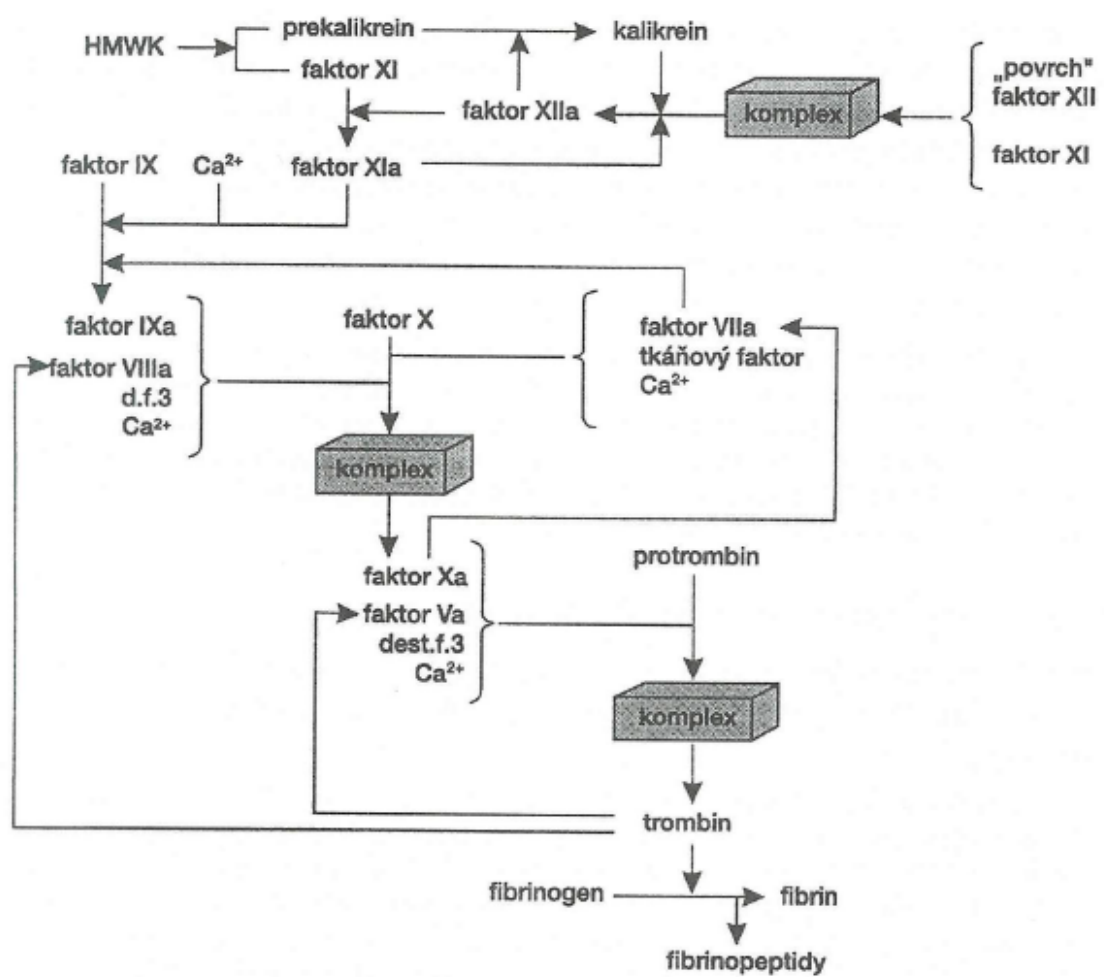
## **2.3 Koagulační kaskáda**

Koagulační faktory spolu interagují, čímž se snaží přeměnit rozpustný fibrinogen na nerozpustný fibrin. Tohle se děje za účinku trombinu, který vzniká z plazmy, tkání a trombocytů. Název koagulační kaskáda je zde proto, že reakce probíhají kaskádovitě [10].

Abychom vytvořili aktivní enzym, je zapotřebí jeho štěpení předchozím aktivovaným enzymem z reakce předtím. Pro primární začátek reakcí je nutná přítomnost iontů vápníku. Koagulační kaskádu můžeme rozdělit do dvou fází, vnitřní a vnější část [10].

Vnější systém neboli primární způsob aktivace, je spuštěn vazbou faktoru VIIa a tkáňového faktoru TF. Toto spojení aktivuje (pomocí destičkových fosfolipidů PI a  $\text{Ca}^{2+}$ ) faktor X na faktor Xa. Tento proces vytváří vnější tenázu, což je tetramerní komplex. Aktivovaný faktor X v kombinaci s destičkovými fosfolipidy a faktorem Va vstupuje do komplexu protrombinázy. Z protrombinu pak vzniká trombin, který je pouze schopen aktivovat koagulační faktory XI, IX, VIII, V a trombocyty. Tato cesta se nazývá iniciace. Za vzniku primární tenázy a protrombinázy se začíná vylučovat inhibitor tkáňového faktoru TFPI, který začne zpomalovat reakci TF, až ji zcela zablokuje. Vnější tenáza se totiž pojí na tkáňový faktor. Z toho důvodu vznikl přídatný systém aktivace, neboli vnitřní systém, který je spouštěn zpětnými mechanismy. Trombinem, který vznikl vnější tenázou a protrombinázou, se aktivuje faktor XI, IX, VIII a V. Vytváří se zde vnitřní tenáza ze spojení faktoru IXa a VIIIa, destičkových fosfolipidů a  $\text{Ca}^{2+}$ . Tato tenáza je schopna tvořit dostatek faktoru Xa, který s faktorem Va přetváří protrombin na trombin. Trombin pak přetvoří fibrin na fibrinové monomery. Tyto monomery jsou dále stabilizovány fibrin stabilizujícím faktorem XIIIa. To má za následek vznik nerozpustného fibrinového koagula [11].

Tyto dvě fáze probíhají v organismu zároveň. Pro zahájení koagulace je nejpodstatnější vnější systém, probíhající na povrchu monocytů. Vnitřní systém celý proces zesílí a urychluje. Probíhá na povrchu krevních destiček. Koagulační kaskáda nemusí být striktně dodržována, nemusí mít kaskádovitý průběh [11].



Obrázek 4: Koagulační kaskáda [10]

### 3 FUNKCE DESTIČEK

Nejdůležitější funkcí trombocytů je zástava krvácení. Bez této funkce by došlo ke ztrátě krve z organismu a následnému usmrcení a zániku. Při snaze zastavit krvácení se uplatňuje látková a mechanická funkce [10].

#### 3.1 Hemostáza

Velké ztráty krve mohou způsobit velké škody na organismu. Proto je tělo schopné hemostázy, či zástavy krvácení. Tento proces má chránit tělo před úniky krve.

1. Vazokonstrikce – reakce cév v poraněném místě
2. Činnost trombocytů – tvorba hemostatické zátky
3. Srážení krve – vytvoření definitivního trombu

Trombus se poté za přítomnosti fibrinolýzy a aktivních fibroblastů odstraní a vznikne jizva. Body vypsané výše, jejich aktivita, závisí na druhu poranění, místě a velikosti. Je zřejmé, že velká poranění tepen není lidský organismus bez vnější pomoci schopen zastavit. Naopak poranění kapilár je běžné a tělo je schopno se s ním vypořádat samo [10].

Při poranění dochází k vazokonstrikci, což je zúžení cév vyvolané více faktory. Jde o rychlou odezvu stěny cévy na její poškození. Dochází k zúžení také u ostatních blízkých cév, v důsledku reflexů. Cévy reagují na poranění převážně kvůli myogenní reakce. Důležité látky, podporující vazokonstrikci jsou také tromboxan  $A_2$  ( $TxA_2$ ), tvořící aktivované destičky a serotonin vyplavovaný z denzních granul. Hlavní děj při poranění cév je činnost krevních destiček. Tímto pojmem se myslí jejich adheze, agregace, tvarové změny a sekrece jejich obsahu. Tímto procesem vzniká takzvaný bílý trombus, který funguje jako provizorní zátky, ucpávající malé praskliny v mikrocirkulaci [10].

Při poranění stěny cév dojde k obnažení subendotelového pojiva a destičky začnou adherovat. Adheze vzniká díky kolagenu, který stimuluje trombocyty a von Willebrandovým faktorem. Přílnavost způsobí aktivaci destiček, které rychle začnou měnit svůj tvar, narostou jim panožky, neboli filopodia. Srážením krve se začne uvolňovat trombin, který také aktivuje destičky. Díky tomu začne probíhat agregace (shlukování) [10].

Aktivní destičky mají na svém povrchu receptory, na které reaguje fibrinogen, dovolující agregaci. Z trombocytů se zároveň uvolňuje tromboxan  $A_2$ , který podporuje shlukování. Primární shlukování je děj zpětný, kdy trombocyty mohou volně odtéct s krví. Sekundární shlukování je nevratný proces, při kterém dojde k uvolňování obsahu granul destiček. Uvolní se také adenosindifosfát (ADP) a trombospondin, kteří působí agregačně. Hemokoagulace je pak souborem reakcí enzymů, kdy dojde ke změně krve na nerozpustnou složku [10].

Nazývá se také plazmatický koagulační systém. Účelem je vytvoření nerozpustného fibrinu. V této reakci dochází ke štěpení fibrinogenu za přítomnosti trombinu. Z fibrinogenu se odštěpí fibrinopeptid A a B, ze kterých vzniká monomer fibrinu. Díky faktoru XIIIa se fibrin propojí kovalentními vazbami a tím dojde ke vzniku nerozpustného fibrinu [11].

## **3.2 Aktivita destiček**

O této problematice pojednává článek 1.9 Platelet activation.

## 4 PATOLOGIE DESTIČEK

### 4.1 Trombogenní znaky

Krevní sraženina vzniká v důsledku nadbytku aktivovaného srážení krve nad inhibitory koagulace. Trombóza v arteriích má v mnoha případech původ v ateroskleróze cévní stěny (intimy) nebo jiném poškození stěny. Jde o souběžné působení dlouhodobých dispozic s aktuální příčinou, přičemž čím déle se u nás vyskytují dlouhodobé dispozice, tím menší příčina stačí ke vzniku trombózy [13].

Podle příčin můžeme dělit trombózu na tři skupiny, provokovanou (zjevná přechodná příčina), s přetrvávající příčinou a idiopatickou (bez zjevné příčiny). Riziko trombózy se zvyšuje s rostoucím věkem. Zvýšený sklon k trombóze se nazývá trombofilie a jde buď o vrozenou, nebo získanou formu [13].

**Tabulka 5: Přehled vrozených trombofilií [13]**

Přehled vrozených trombofilií
Deficience inhibitorů
antitrombin
protein C
protein S
Mutace faktoru V
faktor V Leiden
faktor V Cambridge

**Tabulka 6: Přehled získaných trombofilií [13]**

Přehled získaných trombofilií
maligní nádory
autoimunní choroby
obezita
antifosfolipidový syndrom
nefrotický syndrom
sekundární trombocytóza

Nedostatek inhibitorů je možné detekovat z krve pomocí laboratorních testů. Nedostatek antitrombinu a proteinu C vedou k poruchám již u novorozenců a bez antikoagulační šance je malé procento na přežití. Leidenská mutace způsobuje odolnost vůči aktivovanému proteinu C. Tato mutace je nejčastější vrozenou trombofilií. Nejčastější získanou trombofilií je antifosfolipidový syndrom, který nemá zcela jasnou patogenezi [13].

## 4.2 Aterosklerotické znaky

Ateroskleróza (kornatění tepen) je nejobvyklejší formou arteriosklerózy. Postihuje především velké a střední tepny v místech změny druhu proudění z laminárního na turbulentní nebo v místech větvení tepny. Dělí se na časně a komplikované léze. Časně léze se vyznačují tukovými proužky uvnitř tepen, následně pak vzniká aterosklerotický plát. Dochází pak k celkové změně a přestavbě cév, například k zužování cévy. Považuje se za chronické onemocnění, kdy dochází k nadměrnému bujení intimy (vnitřní stěny cévy). Vývoj aterosklerózy probíhá od mechanického zužování tepny (arterie), přes oslabení prostředí a vzniku aneurysmat (výduť cévy), vznik arteriální trombózy, která může vyústit až v akutní ischemický syndrom. Ateroskleróza může za více než 50 % úmrtí, přičemž její rozvoj je rostoucí a je spojen s mnoha rizikovými faktory. Ateroskleróza se vyznačuje také mnoha komplikacemi, jako je trombóza, embolie nebo infarkt myokardu [14, 16].

**Tabulka 7: Rizikové faktory Aterosklerózy [14]**

rizikové faktory nemodifikovatelné	
1.	věk (muži < 55 let, ženy < 65 let)
2.	mužské pohlaví
3.	pozitivní rodinná anamnéza (ICH nebo nekoronární ateroskleróza)
4.	genetické abnormality
rizikové faktory modifikovatelné	
1.	dyslipidemie
2.	hypertenze
3.	kouření cigaret
4.	diabetes mellitus
5.	revmatoidní artritida
6.	nadváha/obezita
7.	intraabdominální akumulace tuku
8.	další - chronický zánět, infekce, poruchy koagulace/fibrinolýzy, snížená fyzická aktivita

## 4.3 Predispoziční znaky

Mezi predispoziční znaky můžeme zařadit získané inhibitory hemostázy. Jde o vzácná onemocnění, kdy se vytváří protilátky proti faktorům hemostázy. Tato onemocnění jsou doprovázena zvýšenou krvácivostí a jinými projevy. Pod pojmem inhibitor se rozumí auto nebo alloprotilátka, která má inhibiční účinek proti danému proteinu [17].



### **4.3.1 Protilátky proti prokoagulačním faktorům**

Mezi protilátky proti prokoagulačním faktorům patří inhibitor faktoru VIII. Toto onemocnění se nazývá Hemofilie typu A a patří mezi jedno z nejčastějších onemocnění této problematiky. Výskyt tohoto onemocnění není vázán ani na rasu či pohlaví, pouze na věk. Autoprotilátky se objevují v 60 % z neznámého důvodu, často v souvislosti s jiným onemocněním. Inhibitor u získané hemofilie nevede k nulové hladině faktoru VIII, ale pouze jej snižuje. Hemofilie A se projevuje krvácením do svalů, kožního krvácení, gastrointestinálního traktu či krvácení do moči (hematurie). Statisticky bylo řečeno, že onemocnění má klesající tendence, umírá na něj méně lidí, častější příčinou smrti jsou pak jiná onemocnění či věk. Léčba Hemofilie A má za úkol zastavit krvácení, snížit působení inhibitoru a léčit vyvolané onemocnění [17].

Další protilátkou proti koagulaci je inhibitor faktoru V, který se vyskytuje v častější míře než dříve. Dominantním projevem je krvácení u více než 60 % nemocných, kdy až 20 % může mít fatální následky [17].

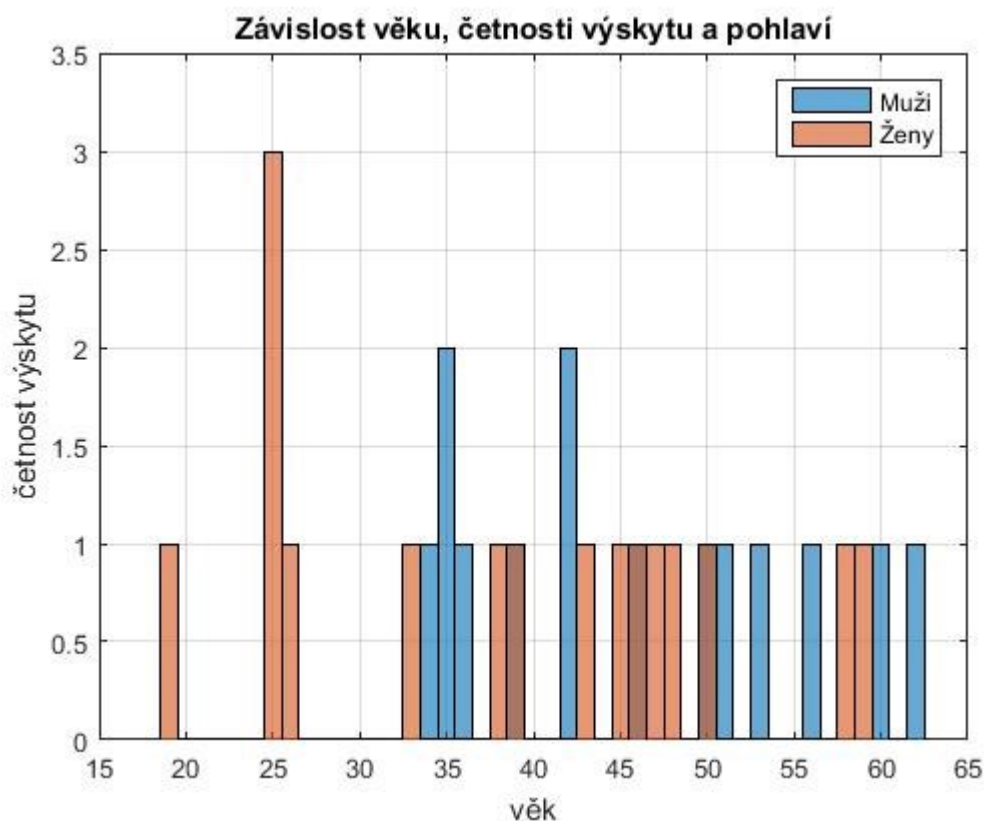
Inhibitory trombinu a protrombinu jsou dalšími velmi vzácnými onemocněními. Dochází k porušení aktivace faktorů V, VIII, XI, nebo XIII a nastává krvácení. Také může dojít k narušení antihemostatických funkcí trombinu a vznikají trombofilní tendence.

Inhibice von Willebrandova faktoru je mnohem vzácnější než von Willebrandova choroba. Její vznik je připisován i jiným, neimunitním mechanismům [17].

## 5 PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část mé bakalářské práce je založena na vytvořené trombocytové studii, která vznikla v nemocnici Nový Jičín mezi lety 2014 až 2016. Tato trombocytová studie je souborem vhodných dárců, kteří mají kvantitu destiček vyšší, než je obvyklé, ale pořád v určitých mezích. Jde o hodnoty trombocytů  $250 \cdot 10^9$  na litr krve a výš. Z krve těchto dárců byl vytvořen trombokoncentrát, dříve nazýván také plazma obohacená o destičky. Tento koncentrovaný přípravek se vyrábí ke zkvalitnění a zefektivnění léčby lidského organismu. Krev dárců byla laboratorně vyšetřena (vyšetření krevního obrazu a genetická vyšetření) a výsledky poskytnuty ke zpracování. Očekává se, že kvantita destiček úzce souvisí i s jejich kvalitou. Pokládáme si zde otázku, zda s kvantitou roste i viabilita trombocytů, dále pak jestli je kvantita vázána na humorální či buněčné faktory nebo je odvozena od genetických predispozic. Již nyní víme, že kvalita koncentrátu je závislá na každém dárci a musíme zohledňovat i jiné další parametry při hledání vhodných dárců.

Pro mou práci jsem si vybrala pomocí prostého náhodného výběru 30 dárců, z toho 14 mužů a 16 žen ve věku mezi 19 a 62 lety. Podle jmenného seznamu jsem si našla v integrovaném klinickém informačním systému IKIS potřebné laboratorní výsledky. Bohužel systém IKIS nemá možnost exportování dat, nelze je získat v elektronické podobě. Řešením bylo veškerá data vytisknout. Stejný problém nastal u dat z molekulárně genetického vyšetření, která byla jen v tištěné formě. Po extrahování těchto údajů jsem si vytvořila dvě knihovny (datové báze) v programu Excel. Toto řešení jsem zvolila z důvodu přehlednosti dat a kompatibilitou s programem MATLAB, ve kterém byla provedena statistická analýza dat.



Obrázek 5: Graf závislosti věku, četnosti výskytu a pohlaví

## 5.1 Statistická analýza dat

Cílem mé statistické analýzy bylo provést zpracování a zhodnocení získaných dat z klinického informačního systému IKIS. Pro tuto analýzu dat jsem si zvolila program MATLAB.

MATLAB (MATrix LABoratory) je speciální programovací jazyk sloužící k technickým výpočtům. Díky jeho přehlednému prostředí se stává velmi kvalitním nástrojem pro vizualizaci, programování a výpočty s daty. MATLAB je vyvíjen firmou Mathworks a můžeme v něm nalézt mnoho Toolboxů, neboli modulů, které jsou určeny pro různou práci s daty [19].

Jelikož není možné vyšetřit veškeré jednotky studie, dárce do studie jsem vybrala pomocí náhodného prostého výběru. Tento výběr zaručí, že má každý prvek stejnou šanci dostat se do vybrané skupiny, na které je provedena analýza [20].

Pro statistickou analýzu jsem si vybrala následující funkce: [19, 20]

M znázorňuje výslednou hodnotu.

A znázorňuje vybraná data.

a) Maximum

Největší prvek v poli.

V MATLABu příkazem:  $M = \max(A)$

b) Minimum

Nejmenší prvek v poli.

V MATLABu příkazem:  $M = \min(A)$

c) Rozsah

Rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou v datech.

V MATLABu příkazem:  $M = \text{range}(A)$

d) Dolní kvartil

Soubor je rozdělen na čtvrtiny, přičemž 25 % prvků nabývá hodnot menších než dolní kvartil.

V MATLABu příkazem:  $M = \text{prctile}(A, 25)$

e) Horní kvartil

Soubor je rozdělen na čtvrtiny, přičemž 75 % prvků nabývá hodnot menších než horní kvartil.

V MATLABu příkazem:  $M = \text{prctile}(A, 75)$

f) Interkvartilové rozpětí

Rozdíl mezi horním a dolním rozpětím.

V MATLABu příkazem:  $M = \text{iqr}(A)$

g) Střední hodnota

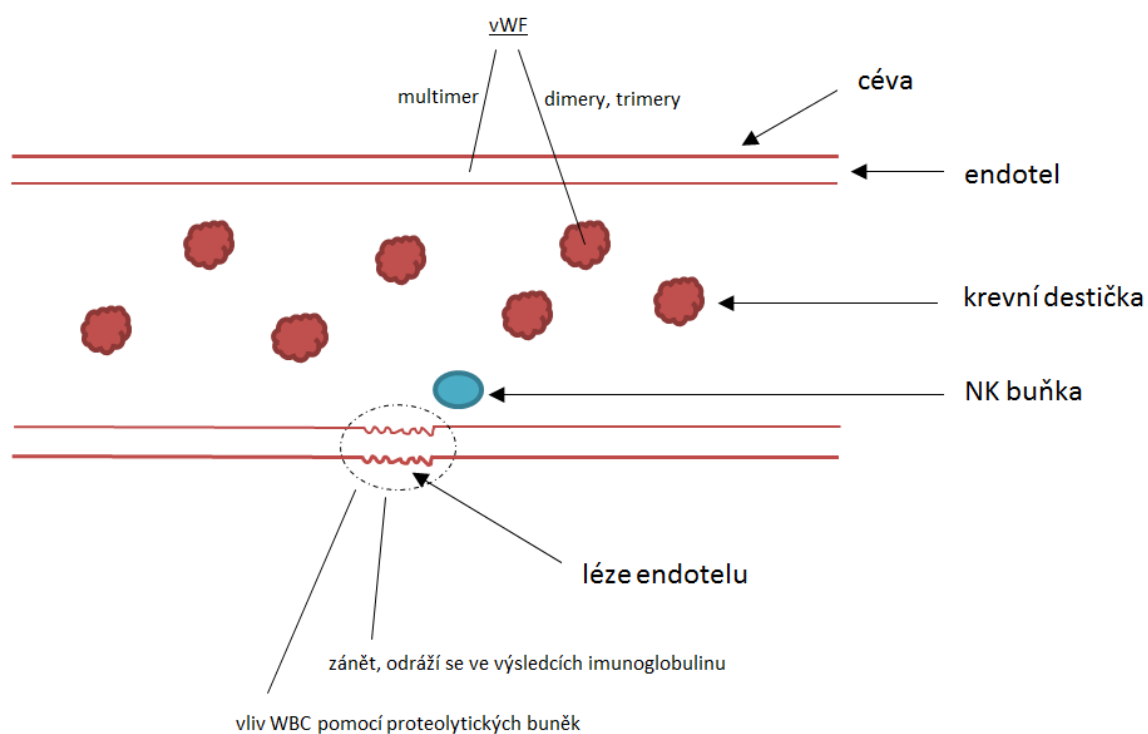
Také nazývána průměrem. Jde o součet prvků, vydělený jejich počtem.

V MATLABu příkazem:  $M = \text{mean}(A)$

- h) Rozptyl (Variance)  
Udává, jak moc jsou hodnoty rozptýleny v souboru.  
V MATLABu příkazem: `M=var(A)`
- i) Medián  
Rozdělí pozorovanou skupinu na dvě stejně velké skupiny, přičemž platí, že 50 % je větších než medián a 50 % je menších než medián.  
V MATLABu příkazem: `M=median(A)`
- j) Modus  
jde o hodnotu, která se v souboru vyskytuje nejčastěji.  
V MATLABu příkazem: `M=mode(A)`
- k) Směrodatná odchylka  
Používá se častěji než rozptyl a vypočítá se jako druhá odmocnina z rozptylu. Určuje, jak moc jsou hodnoty rozptýleny od průměru hodnot.  
V MATLABu příkazem: `M=std(A)`
- l) Spearmanův korelační koeficient  
V MATLABu příkazem: `M=corr(A,B,'type','Spearman')`

Pro grafické zobrazení jsem si vybrala grafy typu boxplot a koláčové grafy. V koláčových grafech jsem znázornila hodnoty genetických vyšetření. V boxplotech jsou vykresleny hodnoty krevního obrazu. Zelené čáry nám určují rozmezí normálních hodnot, červená čára je medián, horní a spodní krabicová část znázorňuje třetí a první kvartil. Vousy značí minimum a maximum, nezahrnutá data jsou pak označeny hvězdičkou (outliery).

## 5.2 Vyšetření krevního obrazu



**Obrázek 6: Céva s trombocyty a lézí endotelu**

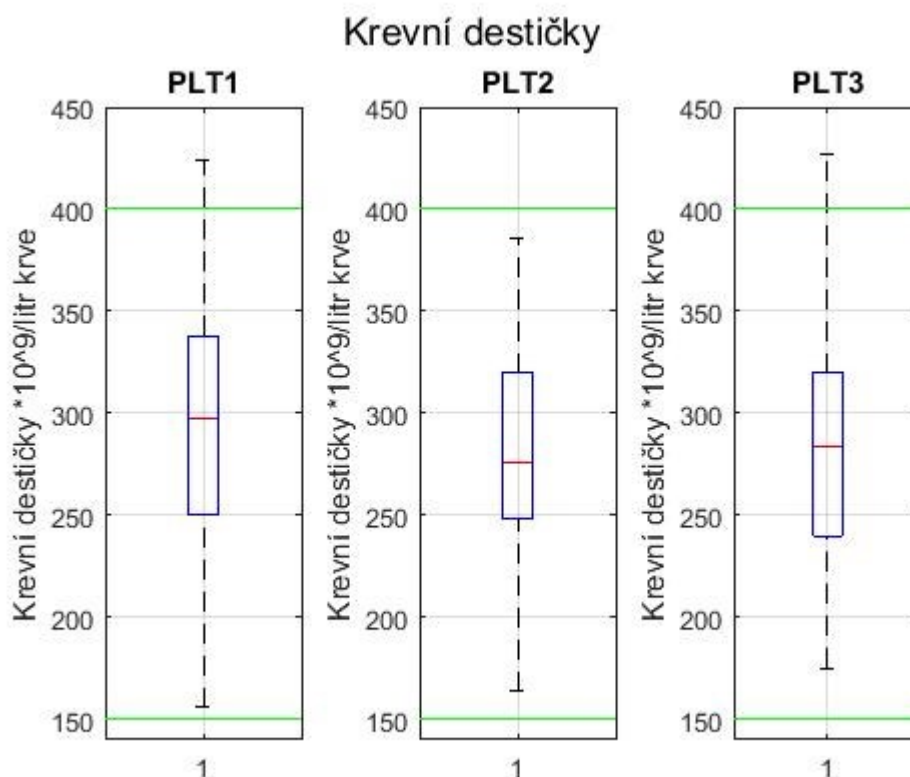
### 5.2.1 Krevní destičky

**Tabulka 8: Statistické výsledky hodnot krevních destiček**

	max	min	rozsah	dolní kvartil	horní kvartil	interkvartilové rozpětí
PLT1	424	156	268	250	338	88
PLT2	386	164	222	248	320	72
PLT3	427	175	252	240	320	80

**Tabulka 9: Statistické výsledky hodnot krevních destiček**

	střední hodnota	rozptyl	medián	modus	směrodatná odchylka
PLT1	294,3667	$3,5767 \cdot 10^3$	297	341	59,8051
PLT2	283,3333	$3,0924 \cdot 10^3$	275,5	272	55,6091
PLT3	288,3333	$3,5946 \cdot 10^3$	284	247	59,9553



**Obrázek 7: Počet krevních destiček zkoumaných pacientů za tři měření**

## 5.2.2 Bílkoviny

Imunoglobuliny A (plazmatické bílkoviny) se primárně účastní na slizniční imunitě, k nejčastějšímu deficitu dochází právě na třídě IgA [28].

Imunoglobulin G je jednou ze tříd imunoglobulinů, které se účastní všech možných typů imunitních reakcí, jde o tzv. pozdní protilátky, které určují chronické záněty [27].

Imunoglobulin M se také účastní všech typů imunitních reakcí. Jde o časné protilátky určující akutní záněty [26].

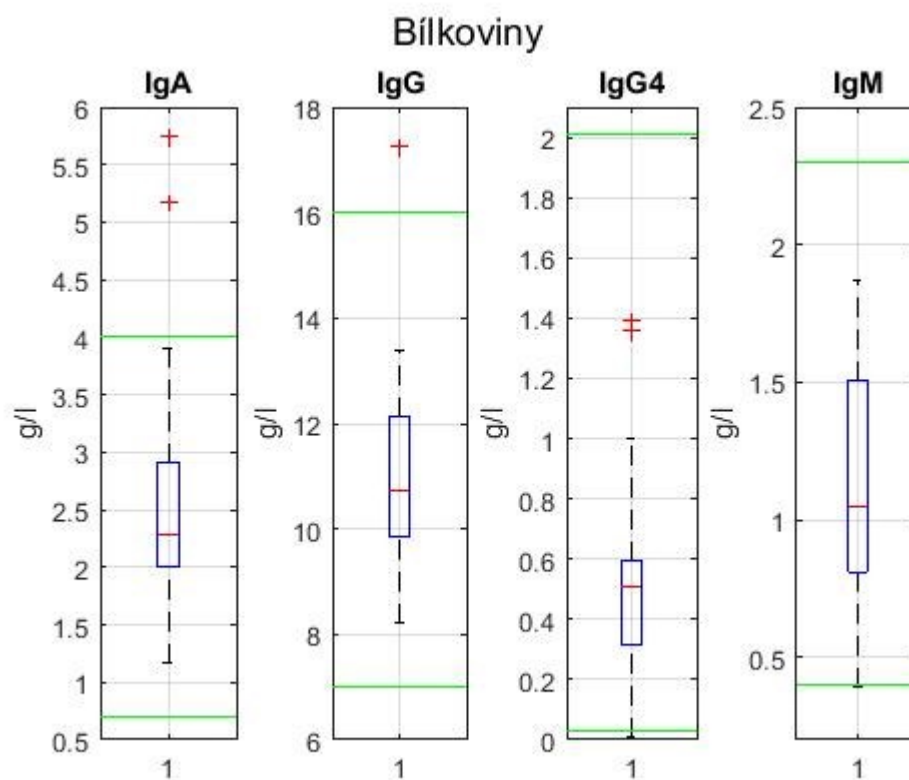
CIK C1q jsou cirkulující imunitní komplexy tzn. agregáty protilátek a antigenů, které cirkulují v krvi.

**Tabulka 10: Statistické výsledky hodnot bílkovin**

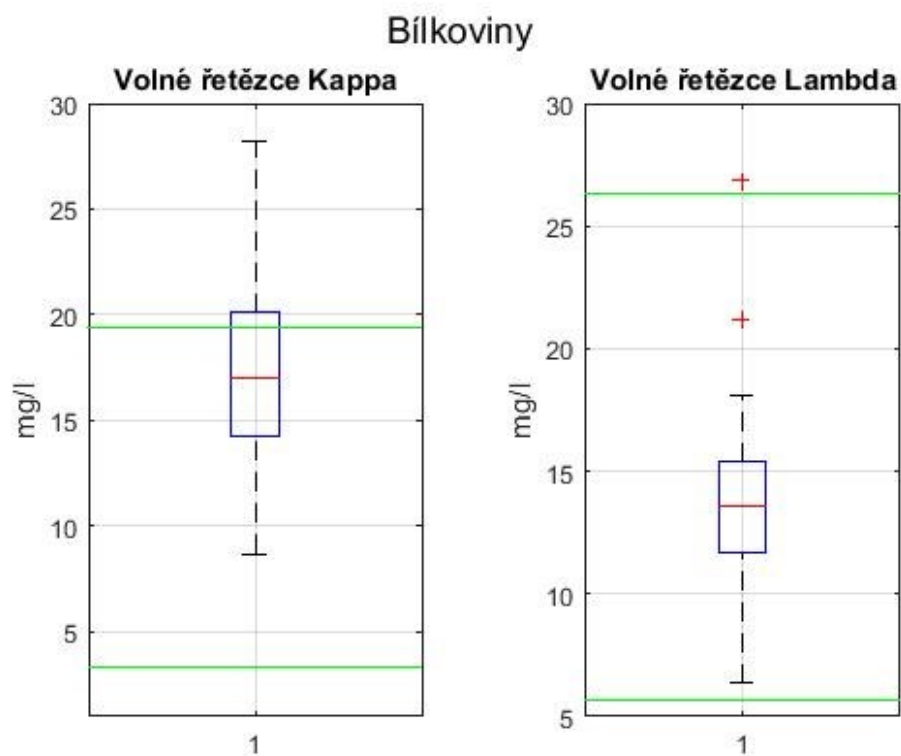
	max	min	rozsah	dolní kvartil	horní kvartil	interkvartilové rozpětí
IgA	5,74	1,17	4,57	2	2,91	0,91
IgG	17,27	8,22	9,05	9,87	12,14	2,27
IgG4	1,39	0,01	1,38	0,315	0,595	0,28
IgM	1,87	0,39	1,48	0,81	1,51	0,7
Kappa	28,2	8,7	19,5	14,3	20,1	5,8
Lambda	26,9	6,4	20,5	11,7	15,4	3,7
CIK C1q	8,2	1	7,2	1	2,3	1,3

**Tabulka 11: Statistické výsledky hodnot bílkovin**

	střední hodnota	rozptyl	medián	modus	směrodatná odchylka
IgA	2,57	1,1021	2,28	2,28	1,0498
IgG	11,118	3,0621	10,735	9,74	1,7499
IgG4	0,5024	0,1044	0,51	0,37	0,3231
IgM	1,1093	0,1896	1,045	0,9	0,4354
Kappa	17,5433	20,726	17,05	14,2	4,5526
Lambda	13,84	16,4521	13,55	13,4	4,0561
CIK C1q	2,2667	4,1416	1,2	1	2,0351

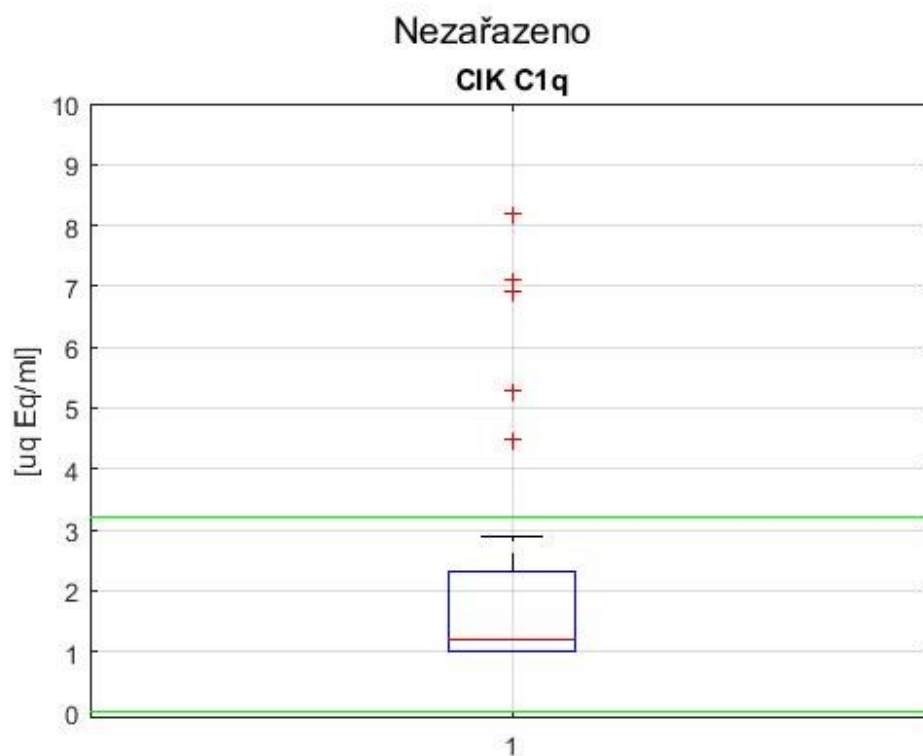


**Obrázek 8: Boxploty imunoglobulinu A, G, G4 a M**



**Obrázek 9: Boxploty volných řetězců Kappa a Lambda**





Obrázek 10: Boxplot CIK C1q

### 5.2.3 Hormony

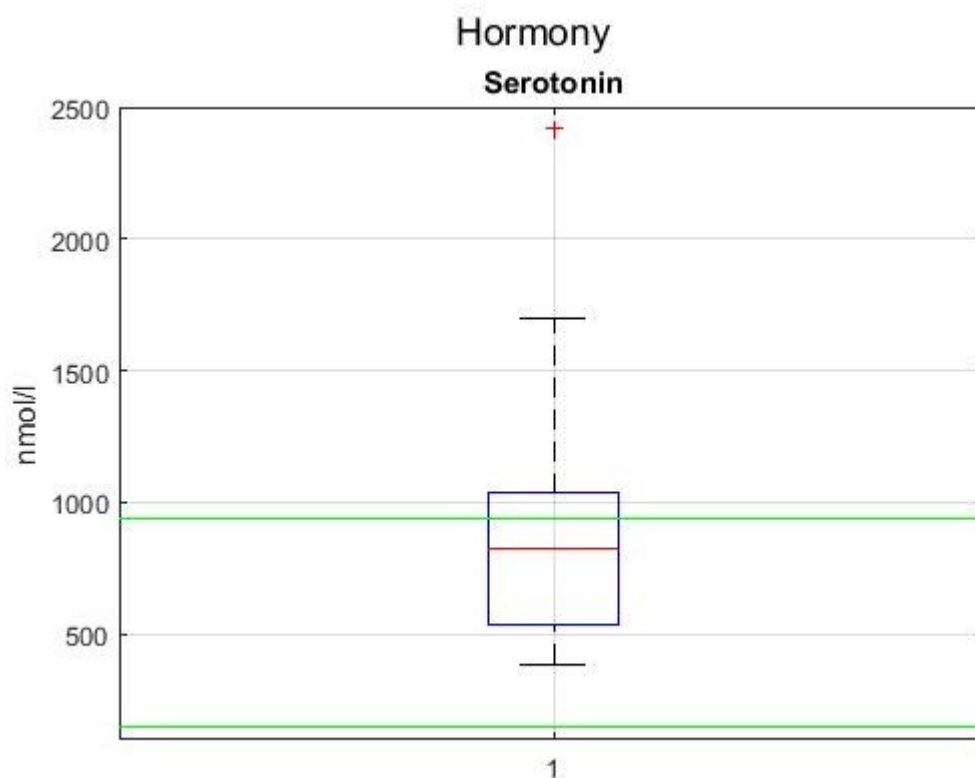
Serotonin je látka nacházející se v buňkách trávicí trubice a také krevních destičkách. Zajišťuje přenos nervových vzruchů, podílí se také na agregaci krevních destiček, vazokonstrikci, a také nám ovlivňuje náladu [18].

Tabulka 12: Statistické výsledky hodnot hormonů

	max	min	rozsah	dolní kvartil	horní kvartil	interkvartilové rozpětí
Serotonin	2422	386	2036	540	1037	497

Tabulka 13: Statistické výsledky hodnot hormonů

	střední hodnota	rozptyl	medián	modus	směrodatná odchylka
Serotonin	891,8077	$2,105 \cdot 10^5$	824	386	458,7993



**Obrázek 11: Boxplot hormonu Serotoninu**

## 5.2.4 Koagulace

Fibrinogen je plazmatický faktor I, který se tvoří v játrech. Fibrinogen je živnou půdou trombinu, jehož štěpením vzniká fibrin. Zvyšuje se při zátěžích organismu [29].

Von Willebrandův faktor zajišťuje adhezi trombocytů a jejich agregaci. Váže se na faktor VIII [15].

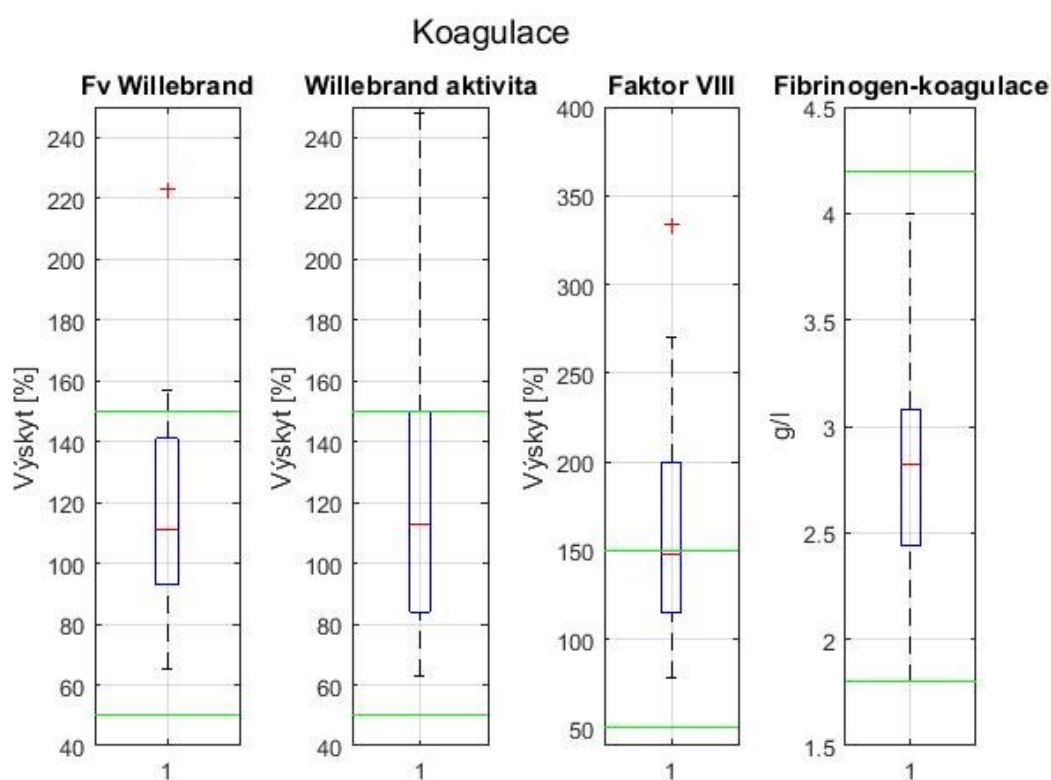
Faktor VIII se váže na von Willebrandův faktor. Jde o antihemofilický faktor. Při nedostatku vzniká onemocnění Hemofilie A [10].

**Tabulka 14: Statistické výsledky hodnot koagulace**

	max	min	rozsah	dolní kvartil	horní kvartil	interkvartilové rozpětí
Fv Willebrand	223	65	158	93	141	48
Willebrand aktivita	248	63	185	84	150	66
Faktor VIII	334	78	256	115	200	85
Fibrinogen-koagulace	4	1,8	2,2	2,44	3,08	0,64

**Tabulka 15: Statistické výsledky hodnot koagulace**

	střední hodnota	rozptyl	medián	modus	směrodatná odchylka
Fv Willebrand	116,0333	$1,1025 \cdot 10^3$	111	88	33,2042
Willebrand aktivita	118,4667	$2,0025 \cdot 10^3$	113	120	44,7489
Faktor VIII	162,2	$3,7029 \cdot 10^3$	147,5	99	60,8511
Fibrinogen koagulace	2,8223	0,2669	2,82	2,27	0,5167



**Obrázek 12: Boxploty koagulačních faktorů a aktivity**

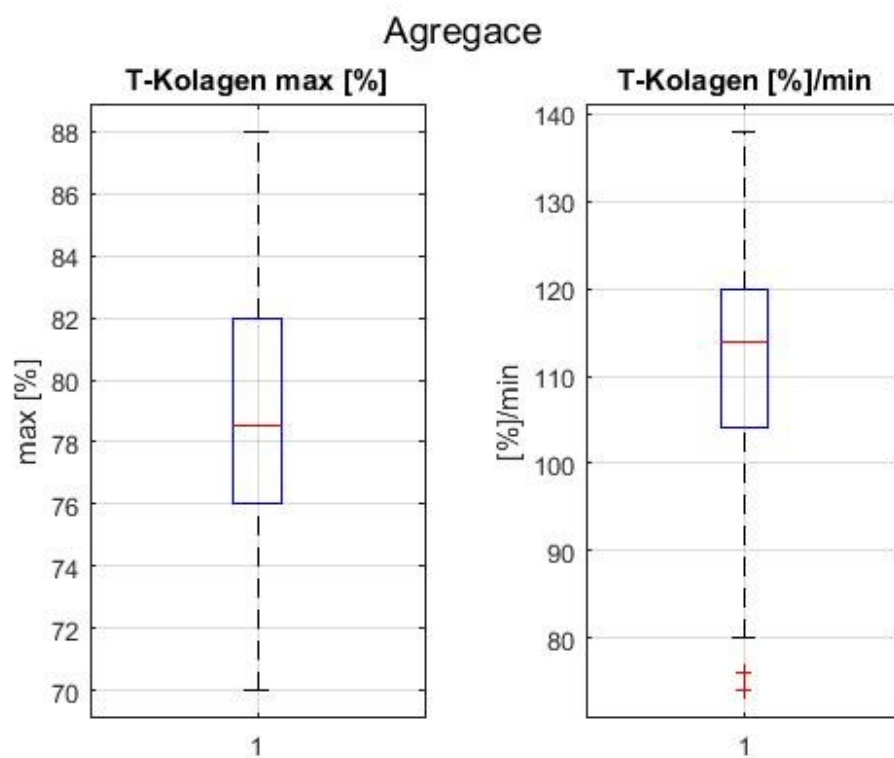
## 5.2.5 Agregace

**Tabulka 16: Statistické výsledky hodnot agregace**

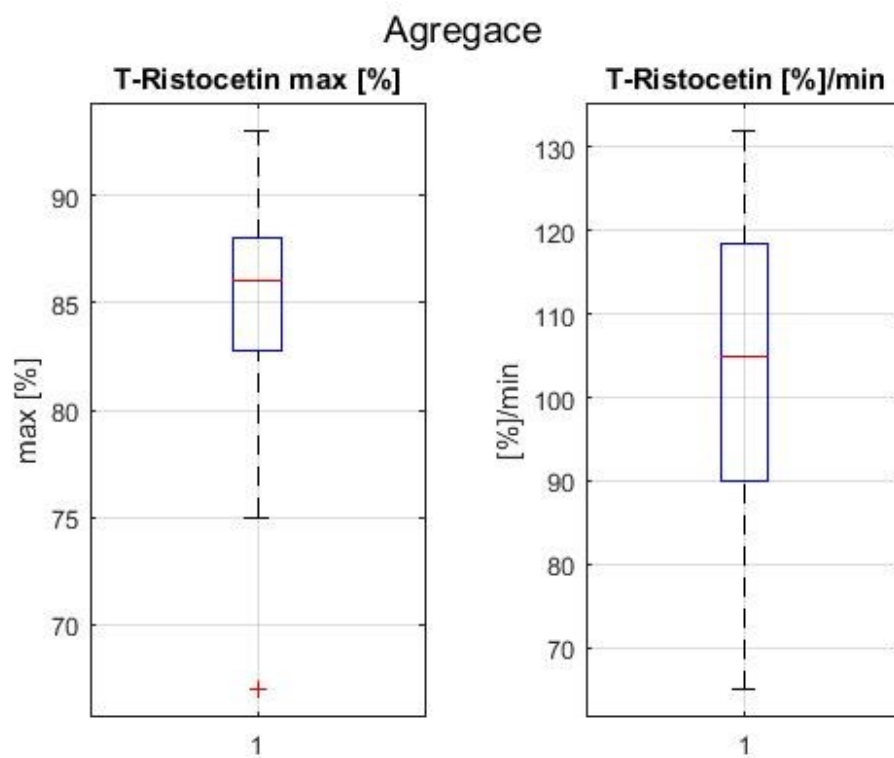
	max	min	rozsah	dolní kvartil	horní kvartil	interkvartilové rozpětí
T-Kolagen max %	88	70	18	76	82	6
T-Kolagen [%]/min	138	74	64	104	120	16
T-Ristocetin max %	93	67	26	82,75	88	5,25
T-Ristocetin [%]/min	132	65	67	90	118,5	28,5
Spontánní agregace max %	6	0	6	0	3	3
Spontánní agregace [%]/min	4	0	4	1	2	1

**Tabulka 17: Statistické výsledky hodnot agregace**

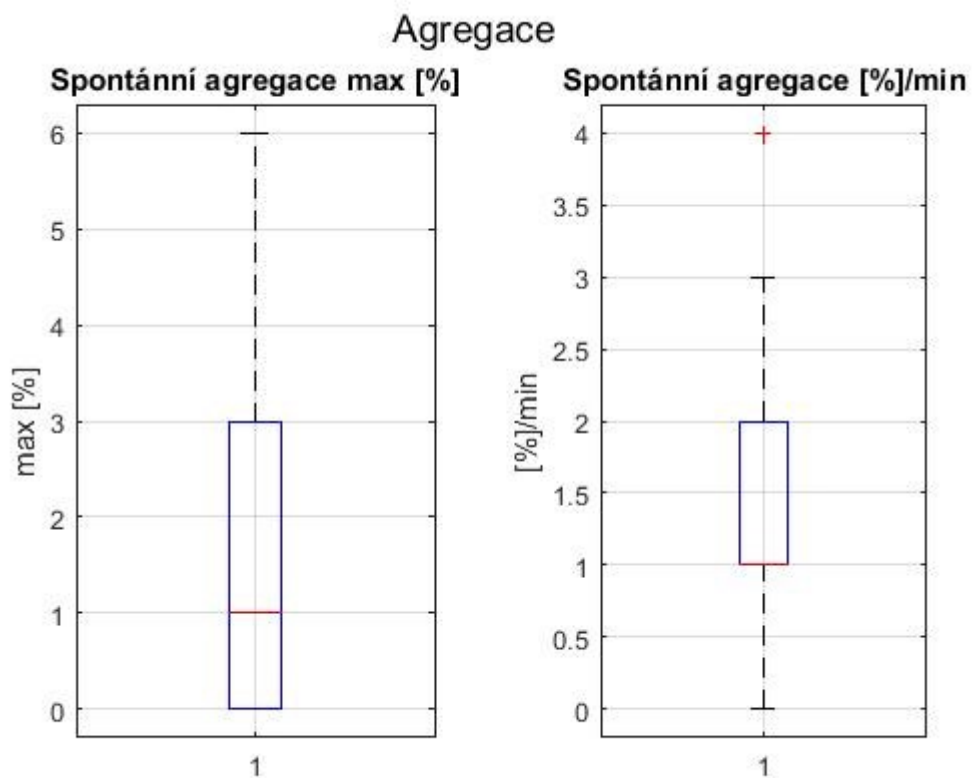
	střední hodnota	rozptyl	medián	modus	směrodatná odchylka
T-Kolagen max %	78,7667	24,6678	78,5	76	4,9667
T-Kolagen [%]/min	110,3667	213,2747	114	114	14,6039
T-Ristocetin max %	84,8621	27,4803	86	86	5,2422
T-Ristocetin [%]/min	103,6207	327,6724	105	90	18,1017
Spontánní agregace max %	1,6667	3,0575	1	0	1,7486
Spontánní agregace [%]/min	1,4	0,8	1	1	0,8944



**Obrázek 13: Boxploty maximálního T-kolagenu a T-kolagenu v % za minutu**



**Obrázek 14: Boxploty maximálního T-ristocetinu a T-ristocetinu v % za minutu**



**Obrázek 15: Boxploty maximální spontánní agregace a spontánní agregace v % za minutu**

### 5.2.6 Imunofenotypizace

CD znaky (Cluster of designation/ differentiation) je nomenklatura hybridomů, buňky vznikající spojením dvou buněk, produkující vysoce specifické protilátky proti některým proteinům, imunoglobulinům. Vyskytují se nejčastěji na leukocytech, endoteliích a jiných buňkách [30].

**Tabulka 18: Význam jednotlivých CD znaků [30]**

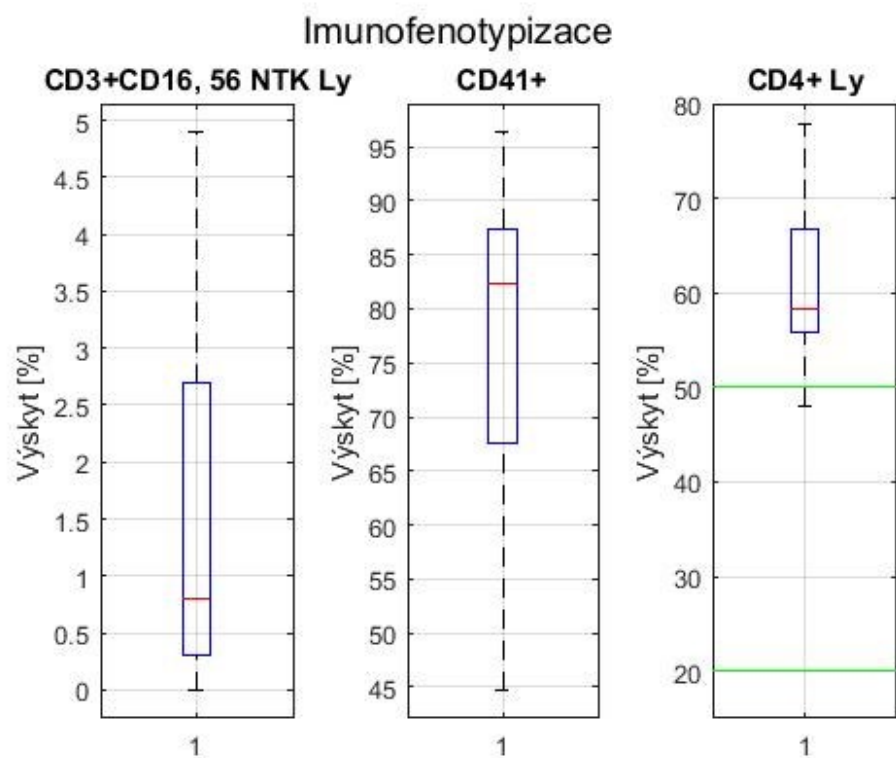
CD3+CD16, 56 NTK Ly	T-Lymfocyty a Natural killer lymfocyty
CD41+	Receptor pro fibrinogen na trombocytech
CD4+ Ly	helpery T-lymfocytů
CD8+ Ly	cytotoxické T-lymfocyty
CD19+ Ly	B-lymfocyty

**Tabulka 19: Statistické výsledky hodnot imunofenotypizace**

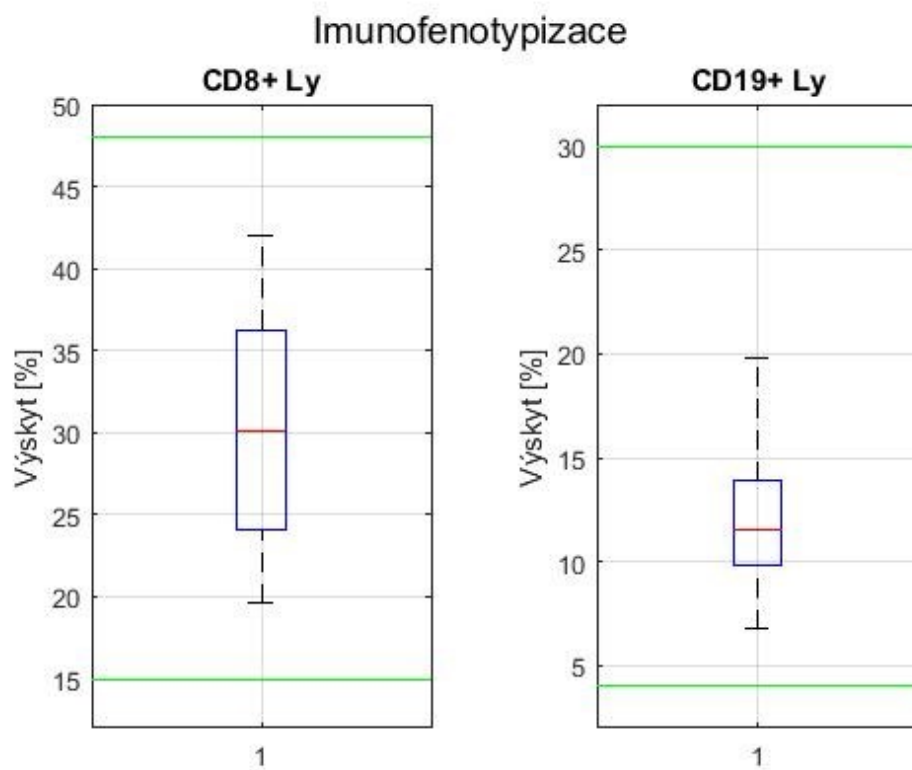
	max	min	rozsah	dolní kvartil	horní kvartil	interkvartilové rozpětí
CD3+CD16, 56 NTK Ly	4,9	0	4,9	0,3	2,7	2,4
CD41+	96,4	44,7	51,7	67,575	87,4	19,825
CD4+ Ly	77,9	48	29,9	55,85	66,75	10,9
CD8+ Ly	42	19,6	22,4	24,075	36,25	12,175
CD19+ Ly	19,8	6,8	13	9,825	13,875	4,05

**Tabulka 20: Statistické výsledky hodnot imunofenotypizace**

	střední hodnota	rozptyl	medián	modus	směrodatná odchylka
CD3+CD16, 56 NTK Ly	1,4864	2,4689	0,8	0,1	1,5713
CD41+	77,6138	166,9661	82,3	82,3	12,9215
CD4+ Ly	60,9217	67,2518	58,4	48	8,2007
CD8+ Ly	30,4	50,5621	30,1	30,1	7,1107
CD19+ Ly	12,1333	11,6169	11,5	11,5	3,4084



**Obrázek 16: Boxploty imunofenotypizace**



**Obrázek 17: Boxploty imunofenotypizace**



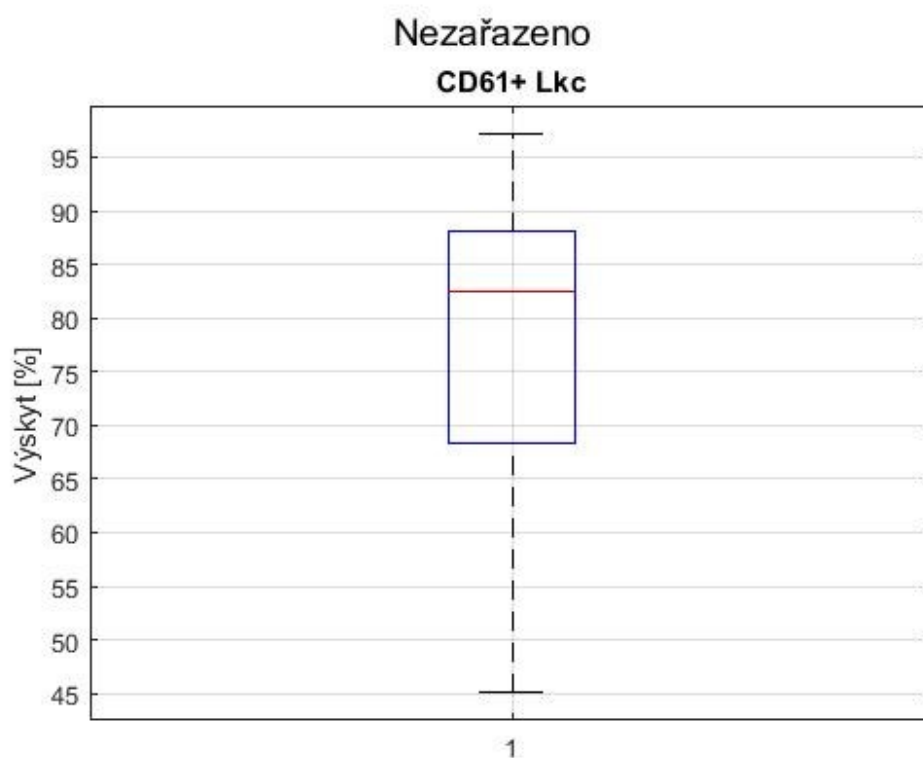
## 5.2.7 Nezařazené

**Tabulka 21: Statistické výsledky hodnot**

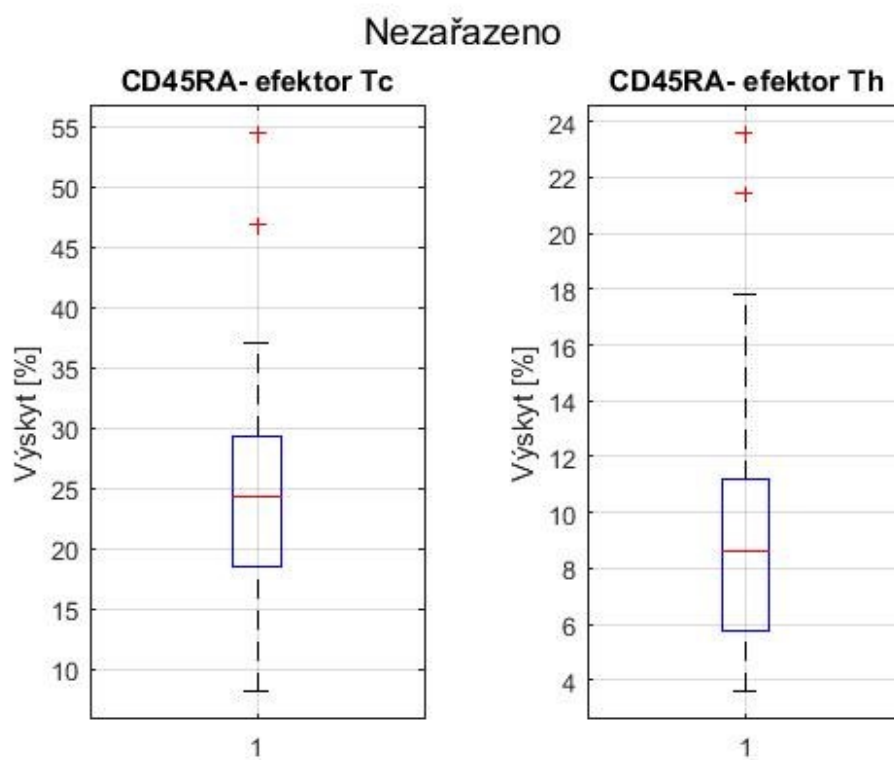
	max	min	rozsah	dolní kvartil	horní kvartil	interkvartilové rozpětí
CD61+ Lkc	97,2	45,1	52,1	68,3	88,1	19,8
CD45RA-efektor Tc	54,5	8,2	46,3	18,55	29,4	10,85
CD45RA-efektor Th	23,6	3,6	20	5,8	11,2	5,4
CD45RA+efektor Tc	55,9	4,7	51,2	14,375	44,075	29,7
CD45RA+efektor Th	13,8	0	13,8	0,1	1,2	1,1
CD4+CD57+efektor Th	22,4	0,1	22,3	0,725	3,975	3,25
CD8+CD57+efektor Tc	71,2	7,1	64,1	12,6	37,175	24,575

**Tabulka 22: Statistické výsledky hodnot**

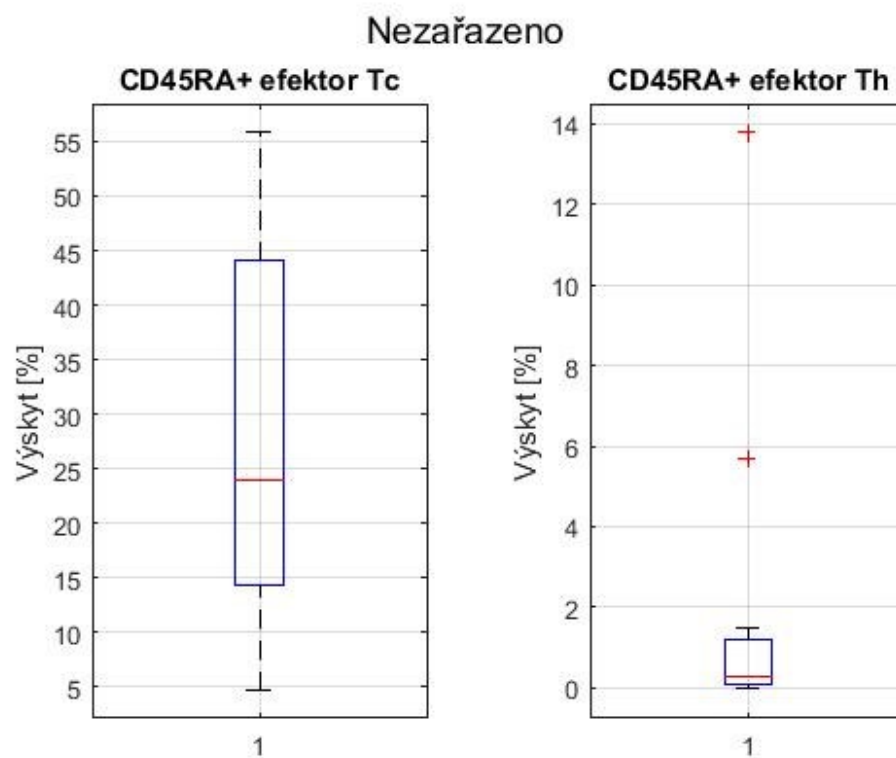
	střední hodnota	rozptyl	medián	modus	směrodatná odchylka
CD61+ Lkc	78,2667	175,0113	82,5	71,1	13,2292
CD45RA-efektor Tc	25,4217	121,1463	24,4	23,3	11,0066
CD45RA-efektor Th	9,8348	29,1869	8,6	5,8	5,4025
CD45RA+efektor Tc	28,4174	247,2015	23,9	4,7	16,559
CD45RA+efektor Th	1,2913	8,8845	0,3	0	2,9807
CD4+CD57+efektor Th	3,5391	25,2152	1,8	0,6	5,0215
CD8+CD57+efektor Tc	27,6348	345,9042	24	8,4	18,5985



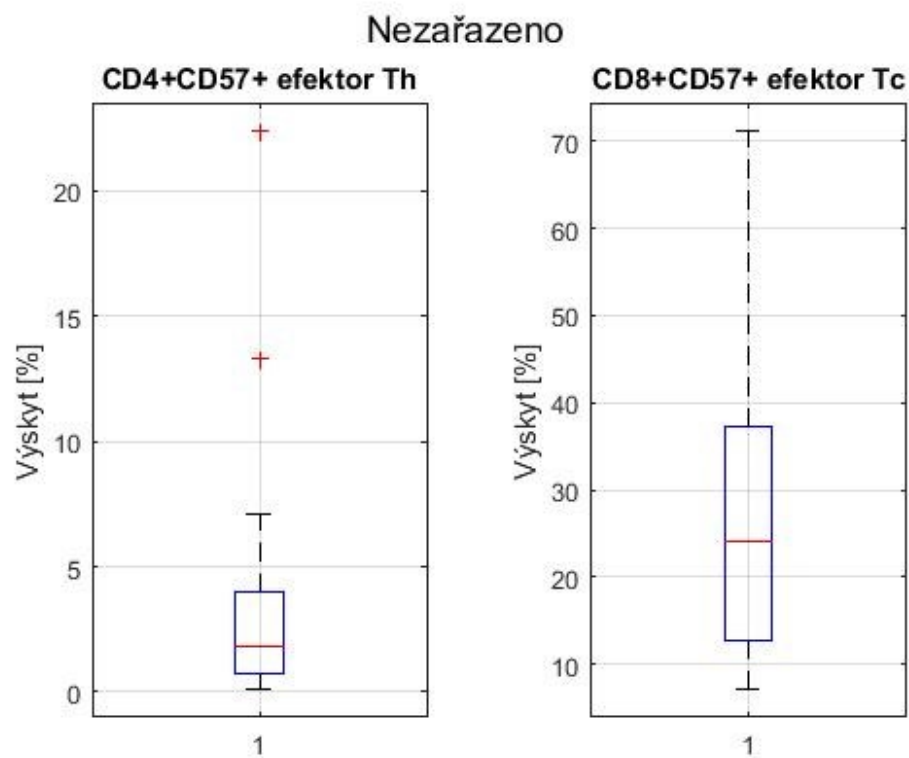
Obrázek 18: Boxplot CD znaku 61+ leukocytů



Obrázek 19: Boxploty CD znaku 45RA-



Obrázek 20: Boxploty CD znaku 45RA+



Obrázek 21: Boxploty CD znaků CD4+CD57+ a CD8+CD57+

## 5.2.8 Leukocyty

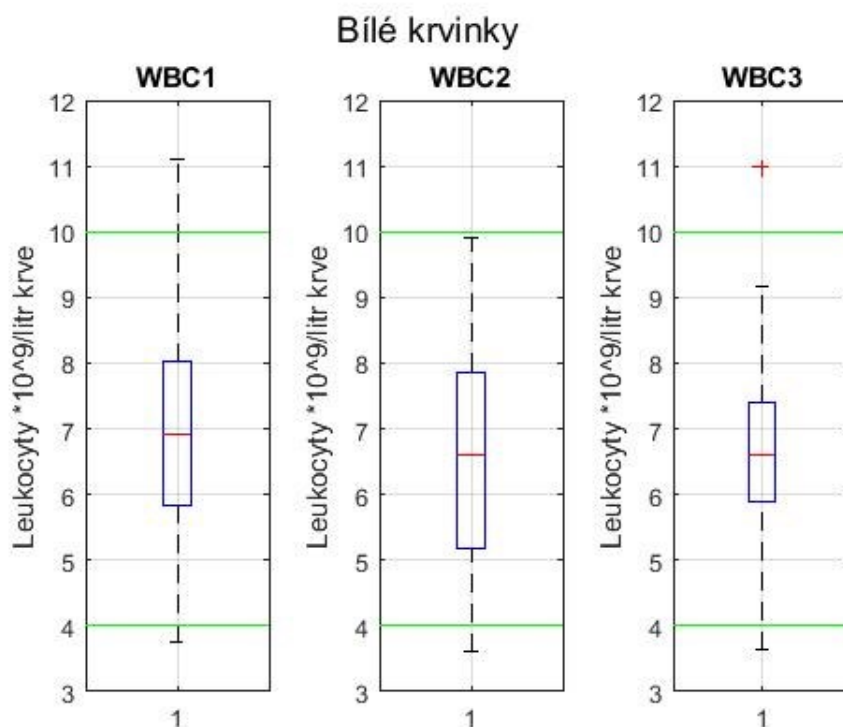
Jde o bílé krvinky, které mají původ v mezenchymu. Zajišťují nám obranyschopnost a metabolické děje v těle. Leukocyty vždy obsahují jádro, jsou bezbarvé a mají kulovitý tvar. Dělí se podle stavby na polynukleáry granulocyty eozinofilní, bazofilní a neutrofilní a na mononukleáry agranulocyty, kde jsou monocyty a lymfocyty. Dále se můžou dělit podle imunologie na fagocyty a imunocyty [31].

**Tabulka 23: Statistické výsledky hodnot leukocytů**

	max	min	rozsah	dolní kvartil	horní kvartil	interkvartilové rozpětí
WBC1	11,09	3,75	7,34	5,84	8,02	2,18
WBC2	9,92	3,6	6,32	5,17	7,86	2,69
WBC3	10,98	3,65	7,33	5,88	7,4	1,52

**Tabulka 24: Statistické výsledky hodnot leukocytů**

	střední hodnota	rozptyl	medián	modus	směrodatná odchylka
WBC1	6,879	2,6304	6,91	6,9	1,6219
WBC2	6,6743	2,806	6,61	6,63	1,6751
WBC3	6,7823	2,4147	6,61	6,09	1,5539



**Obrázek 22: Boxploty leukocytů (bílých krvinek)**

### 5.3 Spearmanův korelační koeficient výsledků krevních testů

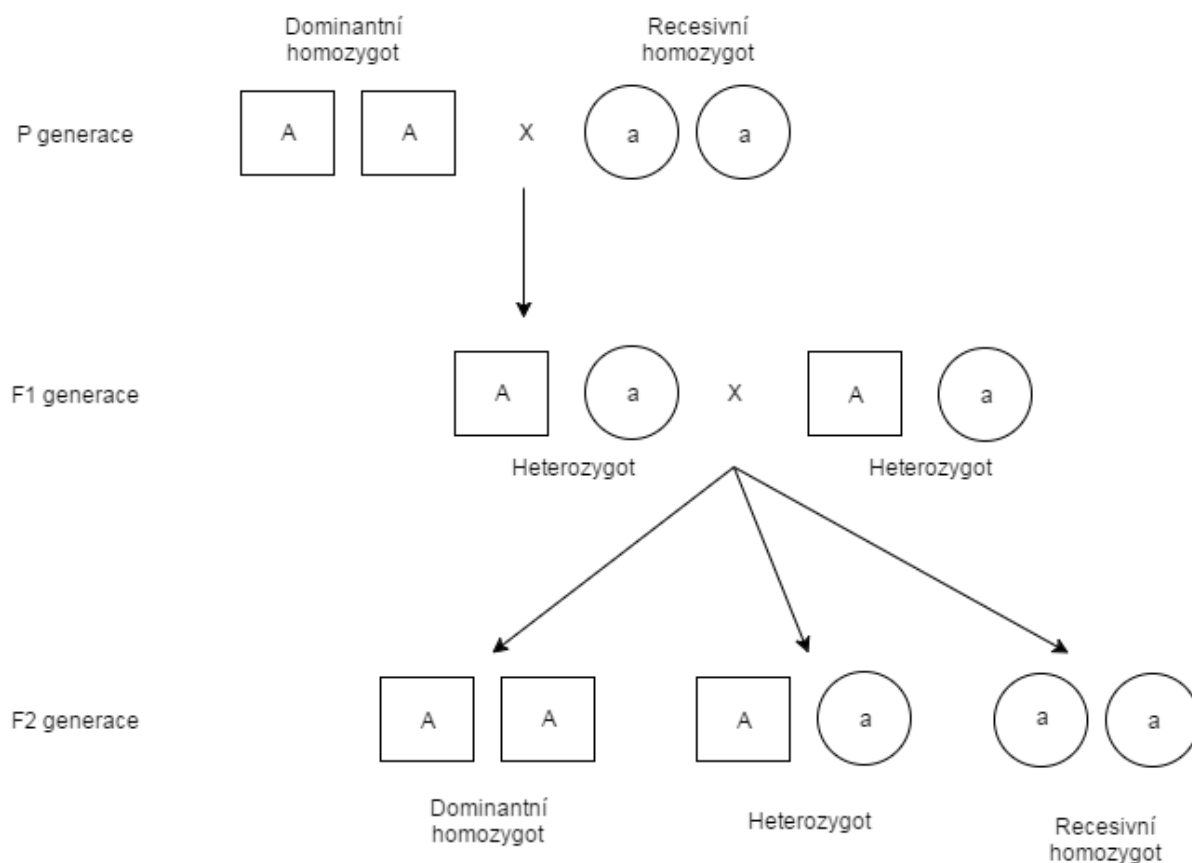
Neparametrická metoda, která je založena na pořadích jedinců, kteří jsou uspořádáni podle jejich velikosti vzhledem ke dvěma sledovaným veličinám. Měří nám vzájemný vztah u dvou proměnných, které se vyskytují společně. Korelační koeficient  $r$  náleží intervalu od  $-1$  do  $1$ . Při  $r = 0$  jde o nezávislost,  $r = 1$  je přímá závislost a  $r = -1$  je nepřímá závislost [20].

**Tabulka 25: Výsledky Spearmanova korelačního koeficientu**

Spearmanův korelační koeficient		
veličina 1	veličina 2	výsledek
PLT1	věk	-0,106
PLT2	věk	0,0246
PLT3	věk	0,0013
PLT1	Faktor VIII	0,071
PLT2	Faktor VIII	0,0267
PLT3	Faktor VIII	0,1518
Fibrinogen Koagulace	Fv_Willebrand	0,0052
Fibrinogen Koagulace	Fv_Willebrand aktivita	0,0069
Fibrinogen Koagulace	Faktor VIII	0,0203
Faktor VIII	Fv_Willebrand	0,5936
Faktor VIII	Fv_Willebrand aktivita	0,7947
Fv_Willebrand	Fv_Willebrand aktivita	0,8889
PLT1	CD4+ Ly	0,0603
PLT2	CD4+ Ly	-0,2718
PLT3	CD4+ Ly	0,0074
PLT1	Serotonin	0,4551
PLT2	Serotonin	0,3546
PLT3	Serotonin	0,4543
PLT1	CIKC1q	0,0105
PLT2	CIKC1q	0,0635
PLT3	CIKC1q	0,0352

## 5.4 Genetické vyšetření

U genetických vyšetření jsem sledovala predispozice k ateroskleróze a trombofilní mutaci. Jednotlivé výsledky jsem opět zapsala do své knihovny. V knihovně se vyskytují výsledky typu wt/wt (homozygot), mut/wt (heterozygot) nebo mut/mut (homozygot), u PAI-1 4G/4G (homozygot), 4G/5G (heterozygot) nebo 5G/5G („wild type“). Wt označuje „wild type“ neboli „nemutantní“ alelu, mut označuje „mutantní“ alelu.



Obrázek 23: Vysvětlení vzniku homozygotů a heterozygotů

### 5.4.1 Dědičné predispozice k žilním trombózám

Nejčastější predispozicí k trombóze je faktor V Leiden (G1691A). Dochází zde k nahrazení nukleotidu G za A na pozici 1691 v genu pro faktor V. Následkem je substituce argininu za glutamin na místě 506. Leidenská mutace pak způsobí rezistenci faktoru V k aktivovanému proteinu C, a tím antikoagulační aktivitě [21].

Další genetická mutace faktoru V má označení haplotyp HR2. Dochází zde k záměně histidinu (R1 alela) za arginin (R2 alela). Díky mutaci poklesne hladina faktoru V o 20 %. Výsledný faktor je pak také rezistentní vůči aktivovanému proteinu C [21].

PAI-1 neboli inhibitor plazminogenového aktivátoru je důležitým regulátorem hemostázy. Existuje několik variant tohoto genu (4G/4G, 4G/5G, 5G/5G). Typ 4G zvyšuje hodnoty PAI-1

proteinu v plazmě. Typ 4G/4G má o 25 % vyšší hladiny PAI-1 než 5G/5G. Pro vznik trombózy je nebezpečný typ 4G v případě, že se vyskytují i jiné mutace, jako například mutace faktoru V Leiden nebo antifosfolipidový syndrom. Alely 5G/5G jsou wild type, 4G/4G mutovaný homozygot a 4G/5G heterozygot [23].

Endoteliální receptor pro protein C (EPCR) se nachází především na endotelu velkých cév a lokalizuje protein C. U osob s A3 haplotypem je spojena jeho vysoká hodnota s rizikem žilní trombózy [21].

Destičkový glykoprotein IIIa je podstatným pro agregaci destiček. Jeho mutace způsobuje zvýšení agregčních schopností destičky a snižuje antiagregační odpověď. Jde tedy o rizikový faktor trombózy [24].

Posledním zkoumaným parametrem zde byl polymorfismus GpIa, který je také rizikovou skupinou pro arteriální trombózy. Dochází zde k záměně na pozici 807C na 807T. Tyto alely (807T) mají 2x vyšší aktivitu GpIa/IIa na destičkách [25].

**Tabulka 26: Četnost výskytu hodnot wt a mut**

	<b>F.V Leiden</b>	<b>F. V R2</b>	<b>GpIIIa</b>	<b>EPCR</b>	<b>Gpla</b>
wt/wt	28	20	22	20	10
mut/wt	1	9	7	6	12
mut/mut	0	0	0	0	7

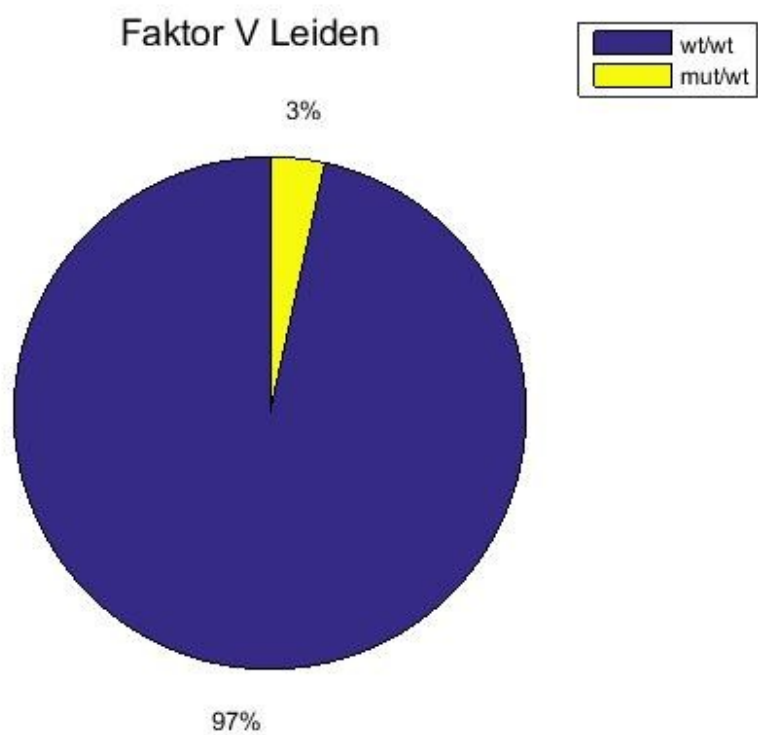
**Tabulka 27: Četnost výskytu hodnot 4G a 5G**

	<b>PAI-1</b>
4G/4G	10
4G/5G	9
5G/5G	9

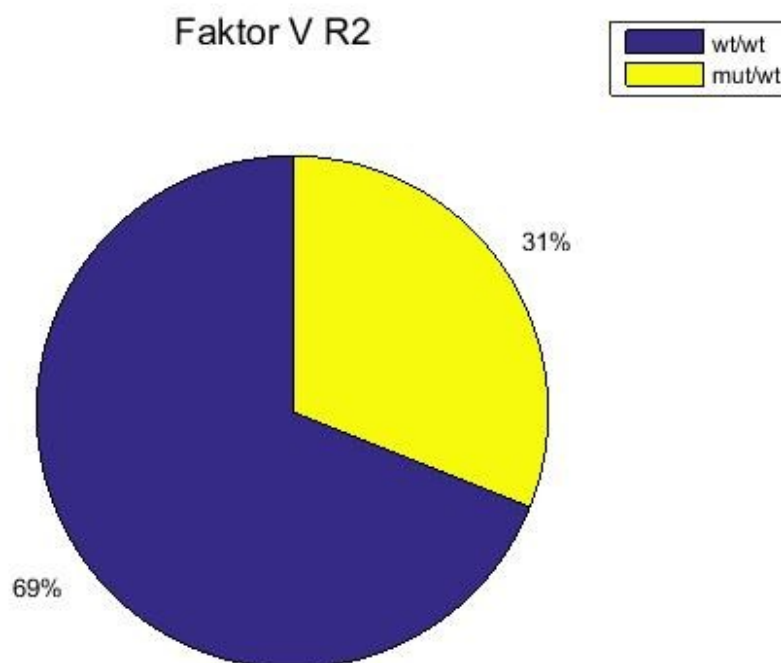
**Tabulka 28: Genetické vyšetření pro trombofilní mutace**

				Trombofilní mutace					
Příjmení	Jméno	Věk	Pohlaví	F. V Leiden	F. V R2	GpIIIa	PAI-1	EPCR	Gpla
Bxxx	Dana	58	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/5G	mut/wt	mut/mut
Bxxx	Radek	35	M	wt/wt	wt/wt	wt/wt	5G/5G	wt/wt	wt/wt
Dxxx	Jana	33	F	wt/wt	mut/wt	mut/wt	5G/5G		mut/mut
Gxxx	Radomír	56	M	wt/wt	wt/wt	mut/wt	5G/5G	wt/wt	mut/wt
Hxxx	Jana	50	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt	5G/5G	wt/wt	mut/wt
Kxxx	Iva	39	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/5G	mut/wt	mut/wt
Kxxx	Jarmila	59	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt			wt/wt
Kxxx	Zdeněk	35	M	wt/wt	mut/wt	mut/wt	4G/5G	wt/wt	wt/wt
Kxxx	Miroslav	60	M						
Kxxx	Denisa	19	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/5G	wt/wt	mut/mut
Kxxx	Petr	53	M	wt/wt	mut/wt	wt/wt	4G/4G	wt/wt	mut/mut
Mxxx	Kristýna	26	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/4G	wt/wt	mut/wt
Mxxx	Markéta	25	F	wt/wt	mut/wt	wt/wt	4G/4G		mut/wt
Mxxx	Hana	48	F	wt/wt	mut/wt	wt/wt	4G/5G	wt/wt	mut/mut
Mxxx	Renáta	46	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/5G	mut/wt	wt/wt
Nxxx	Rastislav	62	M	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/4G	wt/wt	wt/wt
Nxxx	Daniela	25	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt	5G/5G	wt/wt	mut/wt
Oxxx	Petra	38	F	wt/wt	wt/wt	mut/wt	5G/5G	mut/wt	mut/mut
Pxxx	Vítězslav	46	M	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/5G	wt/wt	mut/wt
Pxxx	Petr	51	M	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/4G	wt/wt	wt/wt
Qxxx	Monika	43	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/4G	wt/wt	wt/wt
Rxxx	Eva	45	F	wt/wt	mut/wt	wt/wt	4G/5G	wt/wt	wt/wt
Řxxx	Michal	39	M	wt/wt	mut/wt	wt/wt	4G/5G	wt/wt	mut/wt
Sxxx	Milan	34	M	wt/wt	wt/wt	wt/wt	5G/5G	mut/wt	mut/wt
Šxxx	Roman	42	M	wt/wt	wt/wt	wt/wt	4G/4G	mut/wt	wt/wt
Txxx	Tereza	25	F	wt/wt	mut/wt	wt/wt	4G/4G	wt/wt	mut/wt
Vxxx	Zdeněk	50	M	mut/wt	wt/wt	mut/wt	5G/5G	wt/wt	mut/mut
Vxxx	Miroslav	42	M	wt/wt	wt/wt	mut/wt	4G/4G	wt/wt	mut/wt
Vxxx	Pavčina	47	F	wt/wt	mut/wt	wt/wt	4G/4G	wt/wt	wt/wt
Vxxx	Radek	36	M	wt/wt	wt/wt	mut/wt	5G/5G	wt/wt	mut/wt



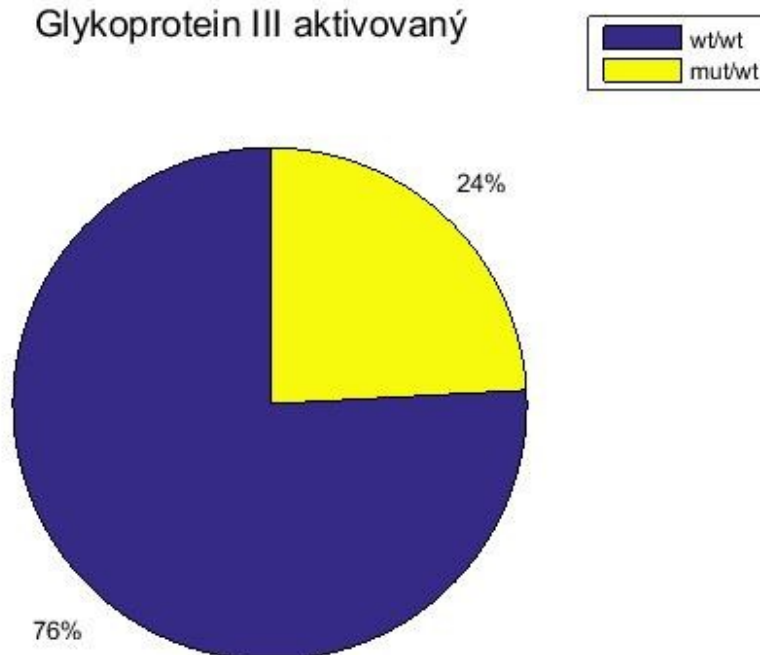


**Obrázek 24: Koláčový graf Leidenské mutace**



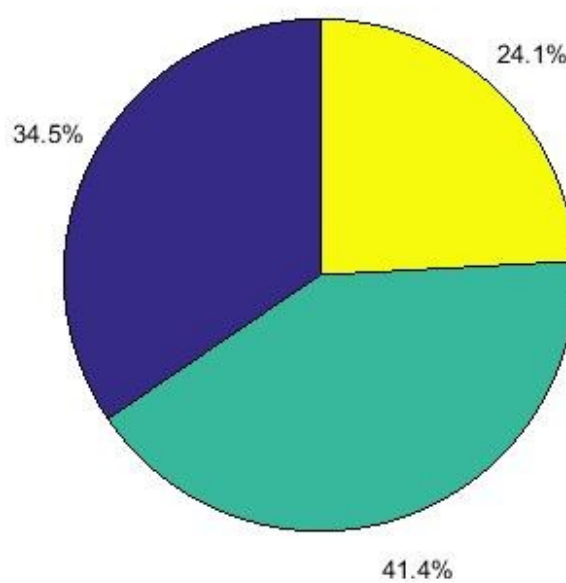
**Obrázek 25: Koláčový graf mutace haplotypu HR2**

Glykoprotein III aktivovaný

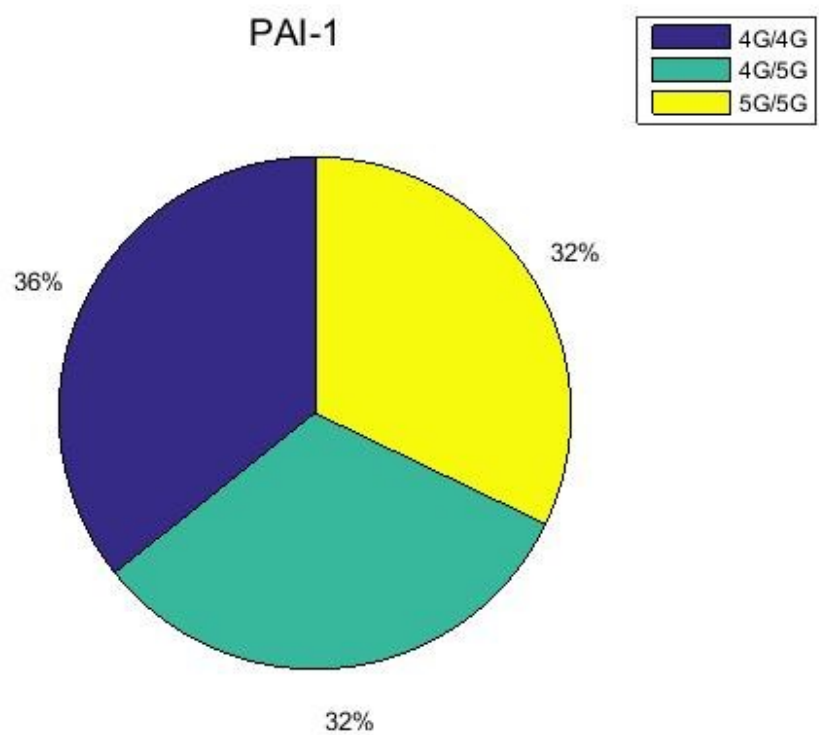


Obrázek 26: Koláčový graf aktivovaného Glykoproteinu III

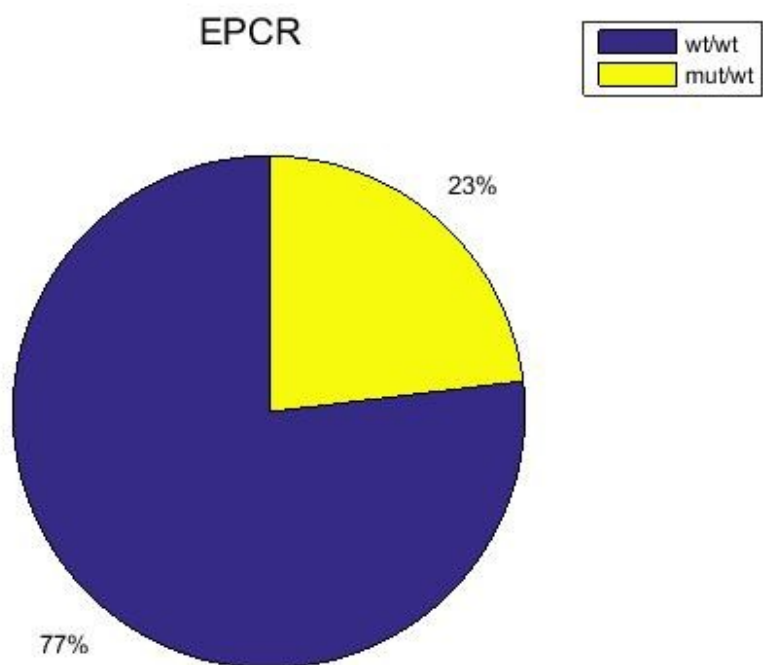
Glykoprotein I aktivovaný



Obrázek 27: Koláčový graf aktivovaného Glykoproteinu I



Obrázek 28: Koláčový graf inhibitoru plazminogenového aktivátoru



Obrázek 29: Koláčový graf EPCR

## 5.4.2 Predispozice k ateroskleróze

Endoteliální syntáza oxidu dusnatého neboli eNOS je formou syntézy NO. Oxid dusnatý má v organismu působit vazodilatačně, protizánětlivě a antiproliferativně. Nízká tvorba NO způsobuje proliferativní (bující) chování hladkých svalových buněk. Polymorfismus genu pro syntázu oxidu dusnatého zvyšuje riziko koronárních příhod a celkovou náchylnost k nemocím srdce [22].

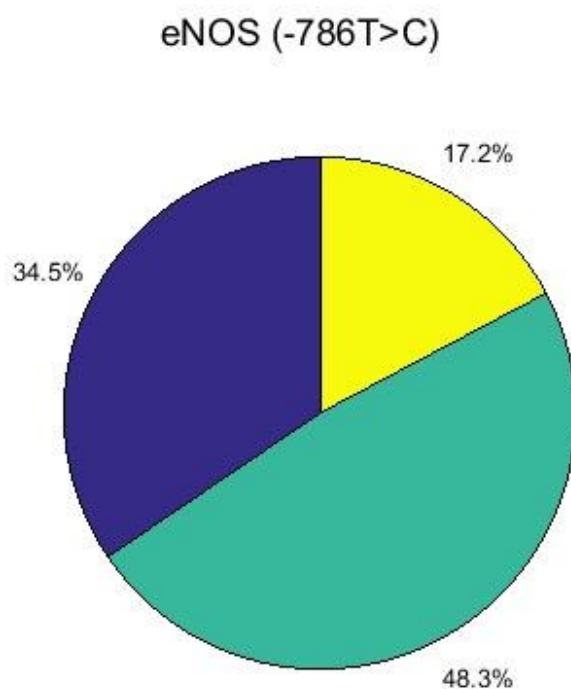
Lymfotoxin alfa (LTA) je imunologicky a zánětlivě aktivní, což hraje hlavní roli při vzniku aterosklerózy [22].

**Tabulka 29: Genetické vyšetření pro predispozice k ateroskleróze**

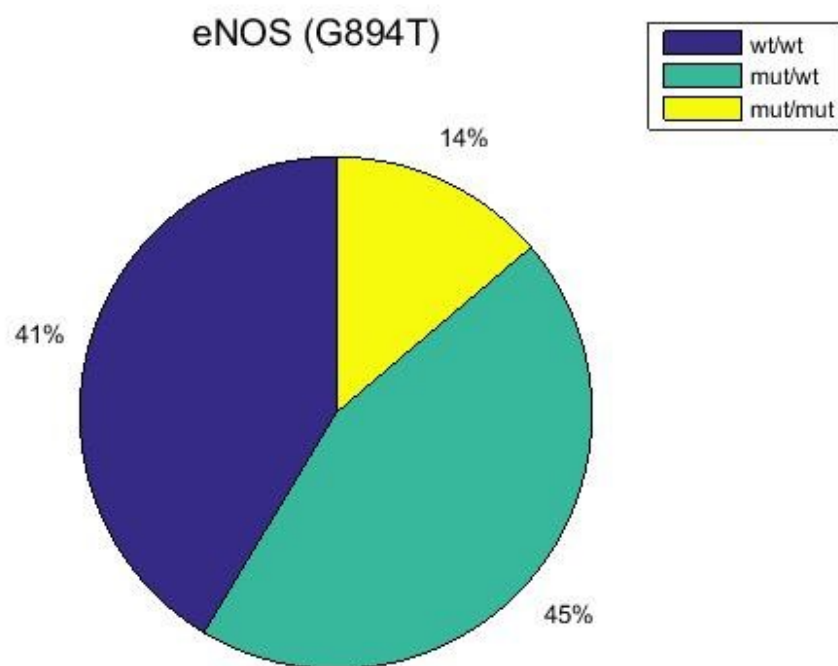
Predispozice k ateroskleróze						
Příjmení	Jméno	Věk	Pohlaví	eNOS (-786T>C)	eNOS (G894T)	LTA
Bxxx	Dana	58	F	wt/wt	mut/mut	mut/wt
Bxxx	Radek	35	M	mut/wt	mut/wt	wt/wt
Dxxx	Jana	33	F	wt/wt	wt/wt	mut/wt
Gxxx	Radomír	56	M	mut/wt	mut/mut	wt/wt
Hxxx	Jana	50	F	mut/wt	wt/wt	mut/wt
Kxxx	Iva	39	F	mut/wt	mut/wt	wt/wt
Kxxx	Jarmila	59	F	mut/wt	mut/mut	wt/wt
Kxxx	Zdeněk	35	M	mut/mut	wt/wt	mut/wt
Kxxx	Miroslav	60	M			
Kxxx	Denisa	19	F	mut/mut	mut/wt	wt/wt
Kxxx	Petr	53	M	mut/wt	mut/wt	mut/mut
Mxxx	Kristýna	26	F	wt/wt	wt/wt	mut/mut
Mxxx	Markéta	25	F	wt/wt	wt/wt	mut/mut
Mxxx	Hana	48	F	wt/wt	wt/wt	wt/wt
Mxxx	Renáta	46	F	wt/wt	mut/wt	mut/wt
Nxxx	Rastislav	62	M	mut/wt	mut/wt	mut/wt
Nxxx	Daniela	25	F	mut/mut	mut/mut	mut/wt
Oxxx	Petra	38	F	wt/wt	wt/wt	mut/wt
Pxxx	Vítězslav	46	M	mut/wt	wt/wt	mut/wt
Pxxx	Petr	51	M	mut/wt	wt/wt	mut/wt
Qxxx	Monika	43	F	mut/mut	mut/wt	mut/wt
Rxxx	Eva	45	F	mut/mut	mut/wt	wt/wt
Řxxx	Michal	39	M	wt/wt	wt/wt	wt/wt
Sxxx	Milan	34	M	wt/wt	wt/wt	mut/wt
Šxxx	Roman	42	M	mut/wt	mut/wt	mut/wt
Txxx	Tereza	25	F	mut/wt	mut/wt	wt/wt
Vxxx	Zdeněk	50	M	mut/wt	mut/wt	mut/wt
Vxxx	Miroslav	42	M	wt/wt	wt/wt	mut/mut
Vxxx	Pavčina	47	F	mut/wt	mut/wt	mut/wt
Vxxx	Radek	36	M	mut/wt	mut/wt	mut/wt

**Tabulka 30: Četnost výskytu hodnot wt a mut**

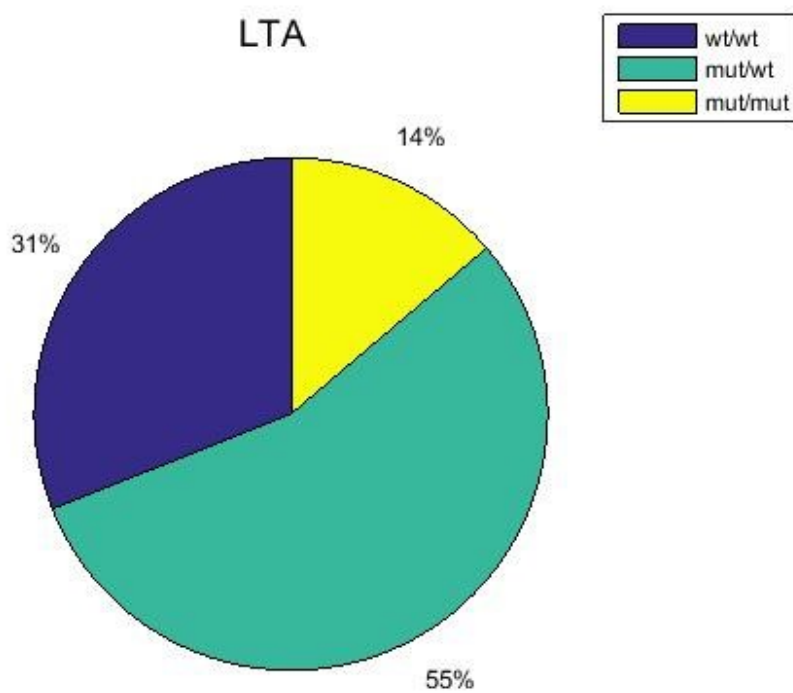
	eNOS (-786T>C)	eNOS (G894T)	LTA
wt/wt	10	12	9
mut/wt	14	13	16
mut/mut	5	4	4



**Obrázek 30: Koláčový graf eNOS (-786T>C)**



Obrázek 31: Koláčový graf eNOS (G894T)



Obrázek 32: Koláčový graf lymfotoxinu alfa LTA

## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zanalyzovat určené parametry pro tvorbu trombokoncentrátu a stanovit klinický závěr. Humorální aktivitu nám zajišťují bílkoviny imunoglobuliny, typ IgG poukazuje na chronické záněty, IgM na akutní záněty, IgA definuje slizniční aktivitu a IgG4 nám určuje záněty alergického typu. Má zvýšené hodnoty u atopií, když nezareaguje v IgE, a jde o tzv. permanentní chronické záněty. Z výsledků imunoglobulinů se neprokázaly žádné akutní ani chronické záněty. Volné lehké řetězce kappa a lambda se uvolňují více podle aktivity B lymfocytů. Jsou známkou zánětlivé aktivity anebo hematoonkologických onemocnění, jako je plasmocytom nebo Waldenströмова makroglobulinémie. Tyto řetězce by se měly spojovat, ale při zánětech k tomu nedochází. Z hodnot se nám neprokázaly chronické záněty. Cirkulující imunitní komplexy se řadí také k imunoglobulinům a zvýšené hodnoty mohou značit infekce nebo autoimunitní choroby. V tomto případě nebyly hodnoty zvýšeny.

Záněty by měly aktivovat trombocyty, ve kterých se nachází hormon serotonin. Horní kvartil boxplotu serotoninu se dostává nad normálové hodnoty, což je způsobeno vyšším počtem krevních destiček, které obsahují více serotoninu (přímá závislost).

Mezi další parametry patří koagulace, kde jsem vyšetřovala von Willebrandův faktor, který je tvořen v endotelu jako multimer a v destičkách jako dimer. Antigen vWFaktor a aktivita se měří jiným způsobem, obě značí to samé. Nedostáváme se zde do patologie, ale hodnoty jsou u obou na rozmezí referenčních hodnot, což může značit prokoagulační až trombogenní aktivitu. Faktor VIII má také zvýšenou aktivitu, je v systému nabuzený, což může vést k trombogenním změnám v organismu. Naopak u fibrinogenu neběží trombogenní aktivita, jeho hodnoty jsou v normálních mezích.

Do agregace se řadí spontánní aktivita, která v tomto případě nebyla vysoká. Destičky vypadaly pořád stejně a nejevily známky spontánní aktivity. Při reakci s T-kolagenem, který je součástí endotelu a značí jeho poškození, nebyla nalezena žádná léze. Také při užití T-ristocetinu, který je kofaktorem a zajišťuje interakci mezi destičkou a von Willebrandovým faktorem, nebyla prokázána žádná významná změna. Z těchto hodnot vyplývá, že krevní destičky reagují na endotelové pokyny přirozeně. Kdyby tomu tak nebylo, byla by spontánní aktivita vysoká.

Buněčná aktivita neboli imunofenotypizace popisuje cluster designation (shluky rozpoznávání) znaky. CD19 či B-lymfocyt je bílá krvinka, která tvoří protilátky v lidském organismu. CD19 je v normě, nachází se v nižší percentilové rovině, což znamená, že B-lymfocyty nejsou aktivovány a nesignalizují tak zánět. Zbylé pozorované CD znaky patří mezi T-lymfocyty. Znak CD3+16 patří do skupiny cytotoxických natural killers lymfocytů, kteří jsou schopni ničit struktury bez předchozího seznámení s antigenem. Z grafu vyplývá, že tyto buňky jsou v referenčních hodnotách, tzn. neničí jiné buňky. CD4 se označují jako pomocné helpery. Z výsledků je patrné, že se nacházejí mimo normálové meze, čímž odrážejí trombogenní a protrombogenní aktivitu. CD41 sleduje aktivitu T-lymfocytů, váže se s CD4. CD8 je v rovnovážném stavu s CD4. Jde o tzv. supresorové (tlumivé) lymfocyty, které mají v tomto případě normální mezní hodnoty. Znak CD61 je dalším znakem na trombocytech. Dle grafu jsou destičky funkční. Poslední zkoumané parametry z rodiny CD znaků mají koncovku Tc (souvisí s CD8, supresory) nebo Th (souvisí s CD4, helpery). Tyto hodnoty byly všechny v normě a korelovaly s očekáváním.

Kvantitativní hodnoty WBC (bílých krvinek) byly v referenční normě. WBC zde nejsou nositeli proteolytické (rozpuštění bílkovin) polymorfonukleární aktivity.

Výsledky Spearmanova korelačního koeficientu potvrdily předpokládané závěry.

Z genetického hlediska jsem pozorovala vybrané mutace. Mezi těmi byla Leidenská mutace, která se u sledovaných osob vyskytovala ve 3 % v heterozygotní formě. Mutace faktoru V při haplotypu HR2 se vyskytovala u jedné třetiny heterozygotně. Z těchto informací jsem došla k závěru, že jde o skupinu, která může spadat k rizikové v souvislosti s trombózou.

Jedna čtvrtina osob má heterozygotní mutaci glykoproteinu III. Mutace na glykoproteinu I se vyskytuje heterozygotně u 41 % a homozygotně u 24 %. U obou je tedy velmi vysoké riziko arteriální trombózy.

Genetická mutace inhibitoru plazminového aktivátoru PAI-1 se vyskytovala přibližně v jedné třetině jako homozygotní a v jedné třetině heterozygotní formou. Jelikož jde o regulátor hemostázy, mutace zvyšuje pravděpodobnost vzniku trombózy při výskytu i jiné mutace (např. Leidenské mutace). Přibližně má tedy 64 % predispozice k této mutaci.

Mutace endoteliálního receptoru proteinu C se vyskytovala heterozygotně u 23 % vyšetřovaných.

Endoteliální syntáza oxidu dusnatého se u obou zkoumaných typů vyskytovala homozygotně přibližně v 15 % případů a heterozygotně u 46 % osob. Lymfotoxin alfa mutoval v 14 % homozygotně a v 55 % heterozygotně.

V této práci jsem zjistila, že krevní destičky odebírané dárčům ze studie jsou funkční v mezích referenčních hodnot, což znamená, že jsou bez problému životaschopné a dokážou plnit úkoly, které jsou zapotřebí pro správnou fyziologickou funkci. Naopak z genetického hlediska prokazují vybraní dárči zvýšenou prokoagulační a trombogenní aktivitu, tedy je zde vyšší riziko srážení, shlukování krevních destiček a jiných změn, které by mohly v jiném organismu těmito mechanismy nabudit ostatní trombocyty k aktivitě.

Trombokonzentrát je tedy odebírán donorům, kteří jsou geneticky potenciálně riziková ve sledovaných parametrech (viz zmíněná možná vyšší agregabilita trombocytů), ale mají zachovanou správnou funkčnost krevních destiček, tzn., destičky jsou schopny reagovat normálně na veškeré podněty, i když se jich v krvi nachází větší, ale fyziologické množství.

Celkově všechna genetická rizika, nepřímo prokázaná v koncentrátu krevních destiček, by neměla být přenositelná, jelikož se v trombocytech nenachází jádro, které by onu genetickou informaci neslo. Bohužel se ale neví o jiných přenosech, které by byly pacienta schopny poškodit.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BRECHER, George, and Eugene P. Cronkite. *"Morphology and enumeration of human blood platelets."* Journal of Applied Physiology 3.6 (1950): 365-377.
- [2] FURIE, Bruce; FURIE, Barbara C. *Mechanisms of thrombus formation.* New England Journal of Medicine, 2008, 359.9: 938-949. DOI: 10.1056/NEJMra0801082.
- [3] MACKMAN, Nigel. *Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004, 24.6: 1015-1022. DOI: 10.1161/01.ATV.0000130465.23430.74
- [4] DAHLBÄCK, Björn. *Blood coagulation.* The Lancet, 2000, 355.9215: 1627-1632. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02225-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02225-X)
- [5] WEIBRICH, Gernot, et al. *Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation.* Growth factors, 2002, 20.2: 93-97. DOI: 10.1080/08977190290031950
- [6] WEIBRICH, Gernot, et al. *Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count.* Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2002, 30.2: 97-102. DOI: 10.1054/jcms.2002.0285
- [7] BORN, G. V. R.; CROSS, MoJ. The aggregation of blood platelets. *The Journal of physiology*, 1963, 168.1: 178.
- [8] ORNITZ, David M.; ITOH, Nobuyuki. Fibroblast growth factors. *Genome biology*, 2001, 2.3: 1.
- [9] ZUCKER, M. B.; NACHMIAS, V. T. Platelet activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1985, 5.1: 2-18.
- [10] TROJAN, Stanislav. *Lékařská Fyziologie.* 4. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [11] ŠLECHTOVÁ, Jitka. Hemostáza-jak ji možná neznáme. *Klin. Biochem. Metab*, 2007, 15: 36.
- [12] FREI, R., et al. Funkce růstových faktorů v lidském organismu a jejich využití v medicíně, zejména v ortopedii a traumatologii. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae čechosl.: Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie*, 2008, 2: 247-252.
- [13] KESSLER, MUDr Petr. Trombofilní stavy. *Interní medicína pro praxi*, 2006, 9: 374-379.
- [14] LUKÁŠ, Karel a Aleš ŽÁK. *Chorobné znaky a příznaky: Diferenciální diagnostika.* 1. Praha: Grada Publishing, a.s., 2014. ISBN 978-80-247-5067-5.
- [15] FENCLOVÁ, Eva. Von Willebrandův faktor - aktivita. In: *Klinickalaborator.cz* [online]. Kladno, 2016 [cit. 2016-10-22]. Dostupné z: [http://www.klinickalaborator.cz/laboratorni-prirucka-brezen-2016/\\_LP\\_16327-L0000047.htm](http://www.klinickalaborator.cz/laboratorni-prirucka-brezen-2016/_LP_16327-L0000047.htm)
- [16] VITÁSKOVÁ, Martina. Ateroskleróza se netýká jenom "sklerotických" babiček. In: *Dlouhovekostbezleku.cz* [online]. 2014 [cit. 2016-10-22]. Dostupné z: <http://www.dlouhovekostbezleku.cz/mod/forum/discuss.php?d=179>
- [17] BULIKOVÁ, MUDr Alena, et al. Získané inhibitory krevního srážení. *Intern Med*, 2008, 10.7: 336-339.
- [18] GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie.* 20. vyd. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-311-7.
- [19] PENHAKER, Marek a Jan KUBÍČEK. *Matematické modelování dat pro vědecké účely.* Opava: Slezská univerzita v Opavě, 2014. ISBN 978-80-7248-942-8.

- [20] ZVÁROVÁ, Jana. *Základy statistiky pro biomedicínské obory*. 3. vydání. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3416-6.
- [21] Dědičné predispozice k žilním trombózám. *Laboratoř forenzní genetiky* [online]. Brno [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: <http://www.lfg-brno.cz/index.php?page=zilni-tromboza>
- [22] Predispozice k ateroskleróze. *Laboratoř forenzní genetiky* [online]. Brno [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: <http://www.lfg-brno.cz/index.php?page=ateroskleroza>
- [23] PAI-1: inhibitor plazminogenového aktivátoru (4G/5G). *Imalab* [online]. 2009 [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/187-pai1-inhibitor-plazminogenoveho-aktivatoru-4g5g.aspx>
- [24] GPIIIa: destičkový glykoprotein IIIa (L33P~T393C). *Imalab* [online]. Zlín, 2009 [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/187-gp11a-destickovy-glykoprotein-11a-133pt393c.aspx>
- [25] GPIa: destičkový glykoprotein Ia (C807T). *Imalab* [online]. Zlín, 2009 [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/187-gpia-destickovy-glykoprotein-ia-c807t.aspx>
- [26] IgM: imunoglobulin M. *Imalab* [online]. Zlín, 2009 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/185-igm-imunoglobulin-m.aspx>
- [27] IgG: imunoglobulin G. *Imalab* [online]. Zlín, 2009 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/185-igg-imunoglobulin-g.aspx>
- [28] IgA: imunoglobulin A. *Imalab* [online]. Zlín, 2009 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/185-iga-imunoglobulin-a.aspx>
- [29] Fibrinogen. *Imalab* [online]. Zlín, 2009 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/186-fibrinogen.aspx>
- [30] CD. *WikiSkripta* [online]. 2015 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/CD>
- [31] WBC: leukocyty. *Imalab* [online]. Zlín, 2009 [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/186-wbc-leukocyty.aspx>
- [32] *Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit*. San Clemente, 2014.
- [33] *Výsledková zpráva molekulárně genetického vyšetření*. Ostrava, 2015.
- [34] LASOTA, Zenon. *Laboratorní výsledky*. Nový Jičín, 2016.

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Vzor genetického vyšetření [33] .....	I
Příloha 2: Vzor laboratorních výsledků krevního testu [34] .....	II
Příloha 3: Příruční leták k ELISA Kitu [32] .....	III

## Příloha 1: Vzor genetického vyšetření [33]



Laboratoř forenzní genetiky, spol. s r. o.

IČO: 255 30 038

IČZ: 72 862 000

Adresa: Tvrdého 2a, 662 99 Brno

Tel.: 543 185 811

www.lfg-brno.cz



### Výsledková zpráva molekulárně genetického vyšetření

Laboratoř lékařské genetiky

Pracoviště: Opavská 962/39, 708 00 Ostrava Poruba, tel.: +420 597 437 520

Primární vzorek: Datum odběru: 03.04.2015 Čas odběru: 08:15  
periferní krev Datum přijetí vzorku: 09.04.2015 Čas přijetí vzorku: 15:00

#### Stanovení trombofilních mutací metodou real-time PCR (SOP OV č. 1)

Jméno a příjmení: [redacted] Dana Kód vzorku: KO 363/15  
Rodné číslo: [redacted] Číslo dokladu: [redacted]  
Pojišťovna: [redacted] Diagnóza: M35.8  
Žádající lékař: MUDr. Zenon Lasota IČP: [redacted]  
Adresa: Nemocnice Nový Jičín a.s., Transfúzní oddělení, Purkyňova 2138/16, 741 01 Nový Jičín

#### Zjištěný genotyp:

Factor V Leiden (G1691A)*	wt/wt	MTHFR (A1298C)*	mut/wt
MTHFR (C677T)*	mut/wt	Factor II (G20210A)*	wt/wt
Factor V R2 (H1299R)*	wt/wt	PAI-1 (4G/5G)*	4G/5G
Factor XIII (V34L)*	wt/wt	EPCR (A4600G)*	mut/wt
EPCR (G4678C)*	mut/wt	GpIa (C807T)	mut/mut
GpIIa (T1565C)	wt/wt		

Vysvětlivky: wt - "wild type" = "ne-mutantní" alela, mut - "mutantní" alela

#### Závěr:

Pacient je heterozygot pro mutaci/variantu: MTHFR (C677T), MTHFR (A1298C), PAI-1 (4G/5G) a EPCR (G4678C) a EPCR (A4600G) a homozygot pro GpIa (C807T). EPCR haplotyp je A1/A3.

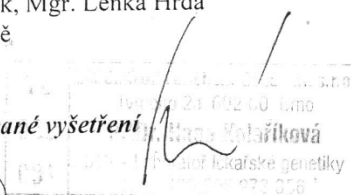
Analýzu provedl: RNDr. Hana Kolaříková, odborný pracovník, Mgr. Lenka Hrdá

Analýzu uvolnil: RNDr. Hana Kolaříková, vedoucí pracoviště

Vedoucí lékař: MUDr. Jana Zvolská

Datum a čas: 16.04.2015 11:54

Vysvětlivky: \* na výsledkové zprávě označuje akreditované vyšetření



## Příloha 2: Vzor laboratorních výsledků krevního testu [34]

<b>Nemocnice Nový Jičín a.s., Purkyňova 2138/16, 74101 Nový Jičín, IČ:25886207</b>		
<b>Transfúzní oddělení</b>		
<b>Prim.MUDr. Zenon Lasota</b>	<b>Tel.: 724 581 681, 739 327 329</b>	<b>IČP: 88001819 (202)</b>
<b>Laboratorní výsledky</b>		
<b>Dana</b>	<b>Dat. nar.: 1959</b>	<b>Č. poj.: </b>
<b>Bydliště: </b>	<b>Kód poj.: </b>	
<b>Rozpory:</b> Rozpory parametrů: Arbitrární jednotky (arb.j.) jsou ekvivalentem indexu positivity (IP) Od 1.5.2014 pro stanovení FLC jsou použita antiséra Binding Site. Referenční meze u pacientů s renálním onemocněním pro poměr kappa/lambda = 0,37 - 3,1.		
<b>MEMO:</b> Laboratorní poznámka: Hodnota IgG - 9,62, měřeno v nemocnici v NJ.		
<b>Stav materiálu:</b> Materiál: sérum; krev		
<b>Sérum, plazma - bílkoviny:</b> S_Imunoglob.A: 2,09 g/l [0.7 ... 4] IgG S,P: 9,62; 9,62 g/l [7 ... 16] IgG1 podtrída IgG S: 5,3 g/l [4.1 ... 10.1] IgG2 podtrída IgG S: 4,11 g/l [1.69 ... 7.86] IgG3 podtrída IgG S: 0,34 g/l [0.11 ... 0.85] IgG4 podtrída IgG S: 0,70 g/l [0.03 ... 2.01] S_Imunoglob.M: 1,36 g/l [0.4 ... 2.3] IgE celkové S: 2,9 kIU/l [0 ... 150] S_Kappa volné řet.: <b>21,3</b> mg/l [3.3 ... 19.4] S_Lambda volné řet.: 6,4 mg/l [5.7 ... 26.3] Kappa/Lambda S vol: <b>3,33</b> 1 [0.26 ... 1.65]		
<b>Sérum, plazma - hormony:</b> S_Thyreoid.stim.h.: <b>5,495</b> mIU/l [0.55 ... 4.78] Serotonin S: <b>1108</b> nmol/l [148 ... 938]		
<b>Sérum, plazma - enzymy:</b> ALT S: 0,55 µkat/l [0.13 ... 0.77]		
<b>Sérologie - sérum, plazma:</b> S_HBsAg: negativ. S_Anti HBs: <b>62,5</b> arb.j. [0 ... 10] S_Stan.anti HCV ELISA: negativ.		
<b>Koagulace:</b> P_Fibrinogen koag.: 4,000 g/l [1.8 ... 4.2] Fibrinogen 1 P: <b>4,91</b> g/l [1.8 ... 3.5] P_Faktor VIII: <b>200</b> 1 [50 ... 150] P_FvWillebrand: 93 1 [50 ... 150] P_FvWillebrand aktivita: 93 % [50 ... 150]		
<b>Agregace trombocytů:</b> P_Agr.d.T-Kolagen: 80/116 P_Agr.d.T-Ristocetin: 86/77 P_Spontánní agregace: 3/1		
<b>Imunofenotypizace:</b> Komentář bunec.imun.: Multimix Ly_CD3+: <b>84,4</b> 10 <sup>9</sup> /l [58 ... 83] Ly_CD19+: 8,2 10 <sup>9</sup> /l [6 ... 20] Ly_CD56+: 3,8 10 <sup>9</sup> /l Ly_CD19+CD38+: 0,7 10 <sup>9</sup> /l Lkc_CD16+: 2,3 10 <sup>9</sup> /l Ly_CD23+: 3,9 10 <sup>9</sup> /l Ly_CD8+: 37,7 10 <sup>9</sup> /l [14 ... 40] FMC 7 Ly: 6,1 1 CD41+ buňky B: 63,0 1		
<b>Moč:</b> U_Hustota moče: 1,011 kg/m <sup>3</sup> [1.002 ... 1.03]		
<b>Moč - chemicky a morfologicky:</b>		

## Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit

2<sup>nd</sup> Generation Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)  
for the Determination of Human Fibroblast Growth Factor 23  
Levels in Plasma or Cell Culture Media

**Immutopics**

*Immutopics, Inc.*

For RESEARCH Use Only

96 Test Kit  
Cat.# 60-6100

Not for use in diagnostic procedures

Store at 2 - 8°C Upon Receipt

### INTENDED USE

This kit is intended for research use only in the determination of human FGF-23 levels in plasma or cell culture media. Reference ranges and clinical utility have not been established.

### INTRODUCTION

Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) is a novel member of a large family of related proteins. The amino-terminal portion of FGF-23 (aa 1-24) is hydrophobic and is likely to serve as a signal peptide allowing its secretion into the blood circulation. Its carboxyl-terminal portion (aa 180-251) shares only limited amino acid homology with other members of the FGF family of proteins.

Renal phosphate wasting disorders leading to hypophosphatemia are among the causes of defective mineralization of bone and growth plate development. Patients with autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR), a rare genetic disorder, carry one of several different FGF-23 mutations that make the protein resistant to proteolytic cleavage. Furthermore, tumors that cause oncogenic osteomalacia (OOM) have been shown to overexpress FGF-23 mRNA making it likely that elevated concentrations of FGF-23 in the blood are the cause of renal phosphate wasting in this group of patients. Consistent with this conclusion, the administration of recombinant FGF-23 to rodents was shown to increase urinary excretion of phosphate thus leading to hypophosphatemia and osteomalacia/rickets. Taken together, all currently available data suggest that FGF-23 is either directly or indirectly involved in the regulation of phosphate homeostasis.

The measurement of human FGF-23 levels in the blood is likely to provide an important diagnostic tool for the laboratory evaluation of patients with a variety of different hypophosphatemic and hyperphosphatemic disorders. Furthermore, the sensitive measurement of FGF-23 is likely to provide novel insights into the regulation of bone and mineral homeostasis.

### TEST PRINCIPLE

This 2<sup>nd</sup> generation Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit is a two-site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of FGF-23 in plasma or cell culture media. Two affinity purified goat polyclonal antibodies have been selected to detect epitopes within the carboxyl-terminal (C-Term) portion of FGF-23. One antibody is biotinylated for capture and the other antibody is conjugated with the enzyme horseradish peroxidase (HRP) for detection. These antibodies bind to both the intact molecule and large carboxyl terminal fragments of human FGF-23.

A sample containing human FGF-23 is incubated simultaneously with the biotinylated capture antibody and the HRP conjugated antibody in a streptavidin coated microtiter well. FGF-23 contained in the sample is immunologically bound by the capture antibody and the detection antibody to form a "sandwich" complex:

Well/Avidin—Biotin Anti-h FGF23 — Human FGF23 — HRP Anti-h FGF23  
(C-terminal) (C-terminal)

At the end of this incubation period, the well is washed to remove any unbound antibody and other components. The enzyme bound to the well is incubated with a substrate solution in a timed reaction and then measured in a spectrophotometric microtiter plate reader. The enzymatic activity of the antibody complex bound to the well is directly proportional to the amount of FGF-23 in the sample. A standard curve is generated by plotting the absorbance versus the respective FGF-23 concentration for each standard on linear or logarithmic scales. The concentration of human FGF-23 in the samples is determined directly from this curve.

### REAGENTS: Preparation and Storage

Store the kit at 2-8°C upon receipt. **Store the standards and controls at -20°C or below after reconstitution.** For the expiration date of the kit refer to the label on the kit box. All components are stable until this expiration date.

**Prior to use allow all reagents to come to room temperature and mix by gentle swirling and inversion.** Reagents from different kit lot numbers should not be combined or interchanged.

- 1. STREPTAVIDIN COATED MICROTITER PLATE (40-0010)**  
One plate with 12 eight well strips (96 wells total). This reagent should be stored in the foil pouch with desiccant at 2 - 8°C and is stable until the expiration date on the kit.
- 2. BIOTINYLATED HUMAN FGF-23 ANTIBODY (40-6110)**  
One vial containing 2.7 mL of biotin labeled anti-human FGF-23 in TRIS buffered saline with protein stabilizers and a non-azide, non-mercury preservative. This reagent should be stored at 2 - 8°C and is stable until the expiration date on the kit.
- 3. HRP CONJUGATED HUMAN FGF-23 ANTIBODY (40-6120)**  
One vial containing 2.7 mL of horseradish peroxidase (HRP) conjugated to anti-human FGF-23 in a stabilized protein solution with a non-azide, non-mercury preservative. This reagent should be stored at 2 - 8°C protected from light and is stable until the expiration date on the kit.  
**NOTE: Make a working Antibody Solution by pipetting equal volumes of Biotinylated Human FGF-23 Antibody and HRP Conjugated Human FGF-23 Antibody prior to use. Mix only the volume required for immediate use. Mix well to ensure homogeneity.**
- 4. HUMAN FGF-23 STANDARDS (40-6131 to 40-6136)**  
Six vials each containing recombinant human FGF-23 lyophilized in a protein matrix with a non-azide, non-mercury preservative. **Refer to vial label for exact concentration.** Before use reconstitute the vial with the FGF-23 concentration of 0 RU/mL with 2.0 mL of deionized water. Before use reconstitute each of the other five vials of standards with 1.0 mL of deionized water. Allow the vials to sit for approximately 20 minutes with occasional gentle swirling and inversion. Assure complete reconstitution before use.  
Use the standards immediately after reconstitution; freeze the unused portion for later use. After reconstitution the standards are stable until the expiration date on the kit when stored at -20°C or below with up to 3 freeze/thaw cycles.
- 5. HUMAN FGF-23 CONTROLS I & II (40-6141 & 40-6142)**  
Two vials each containing recombinant human FGF-23 lyophilized in a protein matrix with a non-azide, non-mercury preservative. **Refer to vial label for control ranges.** Before use reconstitute each control with 1.0 mL of deionized water. Allow the vials to sit for approximately 20 minutes with occasional gentle swirling and inversion. Assure complete reconstitution before use.  
Use the controls immediately after reconstitution; freeze the unused portion for later use. After reconstitution the controls are stable until the expiration date on the kit when stored at -20°C or below with up to 3 freeze/thaw cycles.
- 6. ELISA WASH CONCENTRATE (40-0041)**  
One vial containing 20 mL of a 20 fold concentrate. Before use dilute the contents to 400 mL with deionized water and mix well. Upon dilution this yields a working wash solution containing a surfactant in phosphate buffered saline with a non-azide, non-



mercury preservative. The diluted wash solution should be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit.

**7. ELISA HRP SUBSTRATE (40-0027)**

One bottle containing 16 mL of tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. This reagent should be stored at 2 - 8°C protected from light and is stable until the expiration date on the kit.

**8. ELISA STOP SOLUTION (40-0030)**

One bottle containing 11 mL of 1 M sulfuric acid. This reagent may be stored at room temperature or at 2 - 8°C and is stable until the expiration date on the kit.

**9. PLATE SEALER (10-2016)**

Two included in kit.

**10. HUMAN FGF-23 SAMPLE DILUENT (Optional reagent, must be ordered separately using cat. #30-6631)**

One bottle containing 10 mL of a lyophilized protein matrix with a non-azide, non-mercury preservative. This reagent should be stored at 2 - 8°C and is stable until the expiration date on the bottle. Before use reconstitute with 10 mL of deionized water. Allow the bottle to sit for approximately 20 minutes with occasional gentle swirling and inversion. Assure complete reconstitution before use. Aliquot and freeze (-20°C or below) any unused portion for later use.

**SAFETY PRECAUTIONS**

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide, or sulfuric acid (i.e. ELISA HRP Substrate and ELISA Stop Solution). In case of contact with any of these reagents, wash thoroughly with water. TMB is a suspected carcinogen. Use Good Laboratory Practices. Wash hands before eating. Do not eat, drink or smoke in the work area.

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

1. 1.0 mL and 2.0 mL volumetric pipettes for reconstituting standards and controls.
2. Precision pipets capable of delivering 50 µL, 100 µL and 150 µL.
3. Aluminum foil.
4. Automated microtiter plate washer OR
5. Repeating dispenser for delivering 350 µL and suitable aspiration device.
6. Container for storage of wash solution.
7. Spectrophotometric microtiter plate reader capable of reading absorbance at 450 nm and at 595 - 650 nm.
8. Deionized water.
9. Horizontal rotator capable of maintaining 180 - 220 RPM.
10. Timer.

**SPECIMEN COLLECTION**

The FGF-23 molecule appears to be unstable resulting in decreased immunoreactivity over time. Sample collection and storage procedures should be carried out in an expeditious manner. **Due to the variable lability of the molecule, measurement of the FGF-23 concentration should be made using EDTA plasma or cell culture media.** Two hundred microliters of plasma or culture media are required to assay the sample in duplicate. Centrifuge the sample and separate the plasma or media from the cells. Samples should be assayed immediately or stored frozen at -20°C or below. Avoid repeated freezing and thawing of specimens.

**ASSAY PROCEDURE**

1. Place a sufficient number of Streptavidin Coated Strips in a holder to run FGF-23 standards, controls and samples.
2. Pipet 100 µL of standard, control, or sample into the designated or mapped well. Freeze the remaining standards and controls as soon as possible after use.
3. Pipet 50 µL of the Working Antibody Solution consisting of 1 part Biotinylated Antibody and 1 part HRP Antibody into each well.
4. Cover the plate with one plate sealer, then cover with aluminum foil to avoid exposure to light.

5. Incubate plate at room temperature for three (3) hours on a horizontal rotator set at 180 - 220 RPM.
6. Remove the aluminum foil and plate sealer. **Using an automated microtiter plate washer aspirate the contents of each well. Wash each well five times by dispensing 350 µL of working wash solution into each well and then completely aspirating the contents.** A suitable aspiration device may also be used.
7. Pipet 150 µL of ELISA HRP Substrate into each of the wells.
8. Re-cover the plate with a plate sealer and aluminum foil. Incubate at room temperature for 30 minutes on a horizontal rotator set at 180 - 220 RPM.
9. Remove the aluminum foil and plate sealer. Read the absorbance at 620 nm (see Note) within 5 minutes in a microtiter plate reader against the 0 RU/mL Standard wells as a blank.
10. Immediately pipet 50 µL of ELISA Stop Solution into each of the wells. Mix on horizontal rotator for 1 minute.
11. Read the absorbance at 450 nm within 10 minutes in a microtiter plate reader against a reagent blank of 150 µL of Substrate and 50 µL of Stop Solution.

*If dual wavelength correction is available, set the Measurement wavelength to 450 nm and Reference wavelength to absorbance used in step #9.*

**NOTE: Absorbance may be read at wavelengths from 595 nm to 650 nm depending upon available filters.**

**PROCEDURAL NOTES**

1. It is recommended that all standards, controls and samples be assayed in duplicate. The average absorbance reading of each duplicate should then be used for data reduction and the calculation of results.
2. Keep light sensitive reagents (i.e. HRP Conjugated Antibody, the Working Antibody Solution consisting of combined Biotinylated Antibody and HRP Conjugated Antibody, and ELISA HRP Substrate) in the original amber bottles or other suitable container which is well protected from light.
3. Store any unused Streptavidin Coated Strips in the resealable aluminum pouch with desiccant to protect from moisture.
4. The sample and all reagents should be pipetted carefully to minimize air bubbles in the wells.
5. The sequence and timing of each reagent addition is important as both the immunological and enzymatic reactions are in kinetic modes. The washing step is also an important part of the total assay procedure. **The use of an automated microtiter plate washer is strongly recommended.** All pipeting and washing steps should be performed such that the timing is as consistent as possible.
6. Samples with values greater than the highest standard should be diluted 1:10 or greater with the 0 RU/mL Standard or optional Sample Diluent reagent and reassayed. Multiply the result by the dilution factor. (See Limitations, # 2)
7. Plasma or cell culture media samples may contain fibrin clots or cellular debris. Freeze/thaw of plasma samples may accelerate clot formation. These samples must be centrifuged and decanted prior to assay to remove all particulate material which can cause random high non-specific binding on well surface.
8. Rarely, upon opening the streptavidin plate, small white crystals may be observed in some of the wells. This is entirely cosmetic and will not affect the assay. This condition is reported by other kit manufacturers and results from the final stabilizing buffer used in the coating process.

## CALCULATION OF RESULTS

The two absorbance readings taken before and after the addition of the ELISA Stop Solution allow for the construction of two standard curves using the human FGF-23 standards contained in the kit. **Refer to the individual vial label for exact concentration.** The primary curve used for calculation of results is the second reading taken after the addition of the ELISA Stop Solution and read at 450 nm. This data utilizes the absorbance values obtained with the first five standards. The first reading taken before the addition of the ELISA Stop Solution and read at 595 nm - 650 nm is intended to extend the analytical range to the value of the sixth (highest) standard provided in the kit. **It should be used only for sample results that fall between the value of the fifth and sixth standard.** Results obtained with this reading should not replace the on-scale reading at 450 nm. Each curve should be generated as follows:

### Primary Procedure — Read at 450 nm

1. Calculate the average absorbance for each pair of duplicate assay wells.
2. Subtract the average absorbance of the 0 RU/mL Standard from the average absorbance of all other readings to obtain corrected absorbance.
3. The standard curve is generated by plotting the corrected absorbance of the first five standard levels on the ordinate against the standard concentration on the abscissa using linear-linear or log-log paper. Appropriate computer assisted data reduction programs may also be used for the calculation of results.

The FGF-23 concentration of the controls and samples are read directly from the standard curve using their respective corrected absorbance. If log-log graph paper or computer assisted data reduction programs utilizing logarithmic transformation are used, samples having corrected absorbance between the 0 RU/mL Standard and the next highest standard should be calculated by the formula:

$$\text{Value of unknown} = \frac{\text{Corrected Absorbance (unknown)}}{\text{Corrected Absorbance (2}^{\text{nd}} \text{ Std.)}} \times \text{Value of the 2}^{\text{nd}} \text{ Std.}$$

### Secondary Procedure — Read at 595 nm - 650 nm

1. Calculate the average absorbance for each pair of duplicate assay wells.
2. The standard curve is generated by plotting the absorbance of the three highest standards on the ordinate against the standard concentration on the abscissa using linear-linear or log-log graph paper.
3. The FGF-23 concentration of samples reading only between the fifth and sixth standard are read directly from this standard curve.

### EXAMPLE DATA AND STANDARD CURVE

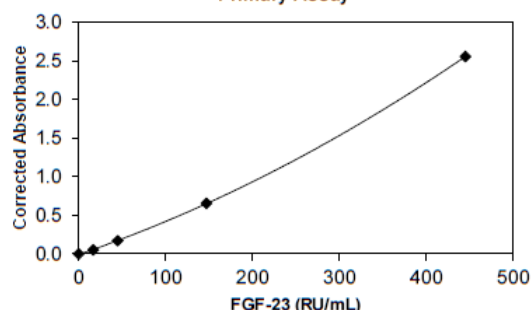
The following are representative examples of data and the resulting standard curves from the primary and secondary procedures. **These curves should not be used in lieu of a standard curve run with each assay.**

PRIMARY ASSAY - 450 nm				
WELL I.D.	ABS	AVERAGE ABS	CORRECTED ABS	RESULTS RU/mL
Reagent Blank	0.000			
	0.000	0.000		
0 RU/mL	0.009			
	0.009	0.009	0.000	
17 RU/mL	0.059			
	0.059	0.059	0.050	
45 RU/mL	0.183			
	0.179	0.181	0.172	
147 RU/mL	0.659			
	0.661	0.660	0.651	
445 RU/mL	2.562			
	2.561	2.561	2.552	

Control I	0.113			
	0.117	0.115	0.106	30
Control II	1.577			
	1.552	1.564	1.555	289
Sample 1	0.310			
	0.319	0.315	0.306	73
Sample 2	2.745			
	2.768	2.756	2.747	*

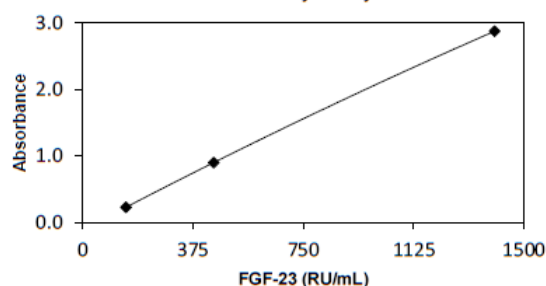
\* > 445 RU/mL. Calculate using secondary assay

Human FGF-23 (C-Term) ELISA  
Primary Assay



SECONDARY ASSAY - 620 nm			
WELL I.D.	ABS	AVERAGE ABS	RESULTS RU/mL
0 RU/mL	0.000		
	0.000	0.000	
147 RU/mL	0.230		
	0.223	0.227	
445 RU/mL	0.897		
	0.901	0.899	
1400 RU/mL	2.888		
	2.864	2.876	
Sample 2	0.960		
	0.969	0.965	477

Human FGF-23 (C-Term) ELISA  
Secondary Assay



### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The lowest concentration of human FGF-23 measurable is 1.5 RU/mL (assay sensitivity) and the highest concentration of human FGF-23 measurable without dilution is the value of the highest standard.
2. The reagents in this 2nd generation Human FGF-23 (C-Term) ELISA kit have been optimized so that the high dose "hook effect" is not a problem for samples with elevated FGF-23 values.



Samples with levels between the highest standard and 750,000 RU/mL will read greater than the highest standard and should be diluted 1:10 or greater with the 0 RU/mL Standard or optional Sample Diluent reagent and reassayed for correct values.

- Grossly lipemic samples may affect the immunological response and it is recommended that results obtained with such samples be scrutinized accordingly.
- Differences in protein concentration and protein type between samples and standards in an immunoassay contribute to "protein effects" and dose biases. When measuring low protein concentration culture media samples against high protein concentration standards, it is recommended that like samples be assayed together in the same assay to minimize this bias.

#### QUALITY CONTROL

To assure the validity of the results each assay should include adequate controls with known levels of human FGF-23. Immutopics recommends that all assays include the laboratory's own human FGF-23 controls in addition to those provided with this kit.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

##### SENSITIVITY

The sensitivity of the 2nd generation Human FGF-23 (C-Term) ELISA as determined by the 95% confidence limit on 20 duplicate determinations of the 0 RU/mL Standard is 1.5 RU/mL.

##### PRECISION

To assess intra-assay precision the mean and coefficient of variation were calculated from 20 duplicate determinations of two samples each performed in a single assay.

Mean Value (RU/mL)	Coefficient of Variation
33.7	2.4 %
302	1.4 %

To assess inter-assay precision the mean and coefficient of variation were calculated from duplicate determinations of two samples performed in 10 assays.

Mean Value (RU/mL)	Coefficient of Variation
33.6	4.7 %
293	2.4 %

##### PARALLELISM

Human plasma samples were diluted with 0 RU/mL Standard and assayed. Results in RU/mL are as follows:

SAMPLE	DILUTION	OBSERVED VALUE	EXPECTED VALUE	% O/E
		VALUE	VALUE	
1	undiluted	60.0		
	1:2	27.9	30.0	93
	1:4	14.3	15.0	95
	1:8	6.8	7.5	91
2	undiluted	182		
	1:2	87.3	91.0	96
	1:4	51.5	45.5	113
	1:8	18.5	22.8	81
3	undiluted	312		
	1:2	116	156	74
	1:4	81.9	78	105
	1:8	44.5	39	114

##### RECOVERY

Various amounts of FGF-23 were added to three different human plasma samples and assayed. Results in RU/mL are as follows:

SAMPLE	ORIG. VALUE	AMOUNT ADDED	OBSERVED VALUE	EXPECTED VALUE	% O/E
			VALUE	VALUE	
1	84	375	470	438	107
		750	891	792	112
		1125	1255	1146	110
2	79	375	394	434	91
		750	770	789	98
		1125	1148	1145	100
3	60	375	484	420	115
		750	906	780	116
		1125	1261	1140	111

#### WARRANTY

This product is warranted to perform as described in its labeling and literature when used in accordance with all instructions. Immutopics, Inc. DISCLAIMS ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, and in no event shall Immutopics, Inc. be liable for consequential damages. Replacement of the product or refund of the purchase price is the exclusive remedy for the purchaser. This warranty gives you specific legal rights and you may have other rights which vary from state to state.

#### REFERENCES

- Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. "Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-23, Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 277:494-98.
- White KE, Evans WE, O'Riordan JLH, Speer MC, Econs MJ, Group 2. Lorenz-Depiereux B, Grabowski M, Mettinger T, Strom TM. "Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23". *Nat. Genet.* 2000, 26:345-8.
- Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White K, Sugimoto T, Imanishi Y, Yamamoto T, Hampson G, Koshiyama H, Ljunggren Ö, Oba K, Yang IM, Miyauchi A, Econs MJ, Lavigne J, Jüppner H. "Fibroblast Growth Factor 23 in Oncogenic Osteomalacia and X-Linked Hypophosphatemia." *N Engl J Med* 2003; 348:1656-63.
- Fukumoto S, Yamashita T. "FGF23 is a hormone – regulating phosphate metabolism – Unique biological characteristics of FGF23." *Bone*, 2007, 40:1190-1195.
- Liu S, Gupta A, Quarles DL. "Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization." *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2007, 16: 329-335.
- Gutiérrez O, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain J, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jüppner H, Wolf M. "Fibroblast Growth Factor 23 and Mortality among Patients Undergoing Hemodialysis". *N Engl J Med* 2008; 359: 584-92.

#### CLIENT SERVICES

To place an order or for technical assistance, contact Immutopics International at (800) 681-6665 or (949) 369-9207 or FAX to (949) 369-9405 or e-mail: [clientservices@immutopicsintl.com](mailto:clientservices@immutopicsintl.com).

Developed and  
Manufactured by:

**Immutopics, Inc.**  
San Clemente, CA 92673

Distributed by:

**Immutopics International**  
San Clemente, CA 92673

[www.immutopicsintl.com](http://www.immutopicsintl.com)

Catalog # 60-6100  
90-6100  
Effective: 07/14

Copyright© Immutopics, Inc.  
San Clemente, CA

This product is covered under U.S. Patent #7,094,551; all rights reserved.